

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 C12N 15/56, 15/63, 9/24, 1/21	A1	(11) 国際公開番号 WO99/11797
		(43) 国際公開日 1999年3月11日(11.03.99)
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/02310</p> <p>(22) 国際出願日 1998年5月26日(26.05.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/252624 1997年9月3日(03.09.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 寶酒造株式会社(TAKARA SHUZO CO., LTD.)(JP/JP) 〒612-8061 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 高山正範(TAKAYAMA, Masanori)(JP/JP) 小山信人(KOYAMA, Nobuto)(JP/JP) 加藤郁之進(KATO, Ikunoshin)(JP/JP) 〒520-2193 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社 中央研究所内 Shiga, (JP) 酒井 武(SAKAI, Takeshi)(JP/JP) 〒036-8216 青森県弘前市大字在府町82番地4 寶酒造株式会社 バイオ弘前研究所内 Aomori, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 弁理士 安達光雄, 外(ADATI, Mituo et al.) 〒550-0001 大阪府大阪市西区土佐堀1丁目6番20号 新栄ビル6階 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, BR, CA, CN, JP, KR, MX, NO, NZ, RU, US, VN, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: GENE</p> <p>(54)発明の名称 遺伝子</p> <p>(57) Abstract An isolated gene having a DNA sequence that codes for a polypeptide having the activity of degrading a sulfated fucose-containing polysaccharide or a polypeptide having an activity that is functionally equivalent to that of the above polypeptide.</p>		

フコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチド、又はその活性と機能的に同等の活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列を有する単離された遺伝子。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	ML	マリ	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CA	カナダ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	US	米国
CF	中央アフリカ	IL	イスラエル	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IN	インド	MX	メキシコ	VN	ヴィエトナム
CH	スイス	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボアール	IT	イタリア	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CM	カメルーン	JP	日本	NO	ノールウェー		
CN	中国	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
CU	キューバ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
CZ	チェッコ	KR	韓国	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア		
DK	デンマーク	LC	セントルシア	SD	スーダン		
EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン		
ES	スペイン			SG	シンガポール		

明 細 書

遺 伝 子

発明の属する技術分野

本発明は、フコース硫酸含有多糖の構造解析や該多糖の低分子化物の調製に有用なフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子、該ポリペプチドの遺伝子工学的製造方法、及び該方法によって得られるポリペプチドに関する。

従 来 の 技 術

海藻由来のフコース硫酸含有多糖は、総称的にフコイダンと呼ばれるフコースを主成分とする硫酸化多糖であり、ガラクトース、グルクロン酸、キシロース、マンノース、グルコース等をも含むものが知られている。これらの構成糖の種類や量は、由来となる海藻の種類によって異なる。例えば、市販シグマ社製のフコイダンを13種もの分子種に分けたという報告がある。〔カーボハイドレート リサーチ (Carbohydrate Research)、第255巻、第213～224頁(1994)〕

これらを大別すれば、ウロン酸を実質的に含まず構成糖の主成分がフコースのものと、ウロン酸を含み構成糖にフコースやマンノースを含むものの2種類に分けられる。

フコース硫酸含有多糖の生物活性についてはマクロファージ活性増強、癌転移抑制、抗凝血等様々なものが報告されていたが、フコース硫酸含有多糖には分子種があるため活性の本体がどの分子種にあるかを調べるためにはフコース硫酸含有多糖を分離精製して調べる必要があった。しかし以前の方法ではその分離が不十分なため薬品として大量調製が困難なものであった。また、フコース硫酸含有多糖は極めて分子量が大きな硫酸化多糖であり、そのまま医薬品として用いるには、抗原性、均一性、抗凝血活性などの問題があるので、フコース硫酸含有多糖をある程度分解することが必要とされていた。

フコース硫酸含有多糖を酵素的に分解して低分子化物を調製する方法は、穏和な条件で反応が行なえるとともに、酵素の基質特異性から均一な低分子化物を得

られる有利な方法である。従来よりアワビ、ホタテ貝、ウニ、海生微生物などがフコース硫酸含有多糖を分解する酵素を生産していることが報告されている。しかし、これらの酵素は一般に生体内に微量に含まれているうえに複数のフコース硫酸含有多糖分解酵素を持っているために単一の酵素を得る為に様々な精製工程が必要となっていた。さらにこれらの酵素のアミノ酸配列や遺伝子構造などは全く明らかとされていなかった。

発明が解決しようとする課題

本発明の目的は、フコース硫酸含有多糖の調製や構造解析、また低分子化フコース硫酸含有多糖の調製に有用なフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子、及び該遺伝子を用い遺伝子工学的に得ることのできるフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドを提供することにある。

課題を解決するための手段

本発明者らは、フコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドのアミノ酸配列及び塩基配列を明らかにするため、フコース硫酸含有多糖分解酵素を産生する微生物の遺伝子について鋭意研究を進めた結果、アルテロモナス属細菌、フラボバクテリウム属細菌由来のフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子が各2種存在することを明らかにすると共に、その全塩基配列を確定し、該ポリペプチドのアミノ酸配列を初めて明らかにし、更に該遺伝子を用いてフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドを工業的に有利に生産する方法をも開発することに成功し、本発明を完成させた。

本発明を概説すれば、本発明の第1の発明は、フコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチド又はその活性と機能的に同等の活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列を有する単離された遺伝子に関する。

本発明の第2の発明は、本発明の第1の発明の遺伝子を含んでなる組換えDNAに関する。

本発明の第3の発明は、本発明の第2の発明の組換えDNAを挿入されてなる微生物、動物細胞又は植物細胞を宿主細胞とする発現ベクターに関する。

本発明の第4の発明は、本発明の第3の発明の発現ベクターにより形質転換さ

れてなる形質転換体に関する。

本発明の第5の発明は、本発明の第4の発明の形質転換体を培養し、該培養物よりフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチド又はその活性と機能的に同等の活性を有するポリペプチドを採取することを特徴とするフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチド又はその活性と機能的に同等の活性を有するポリペプチドの製造方法に関する。

本発明の第6の発明は、配列表の配列番号1～4のいずれかで表されるアミノ酸配列を有し、かつフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチド又はその活性と機能的に同等の活性を有するポリペプチドに関する。

図面の簡単な説明

図1はORF-1とORF-2の位置を示す図である。

図2はフコース硫酸含有多糖の沈殿形成率を示す図である。

図3はfdlAの位置を示す図である。

図4はfdlBの位置を示す図である。

図5はDEAE-セファロースFFを用いたクロマトグラムである。

発明の実施の形態

以下、本発明を具体的に説明する。

本発明は、フコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子に関する。該遺伝子にコードされるポリペプチドの一例としては、アルテロモナス属細菌由来の下記(1)のエンド型フコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドがあげられる。

(1) 下記理化学的性質を有するフコース硫酸含有多糖(以下、フコース硫酸含有多糖-Fと称す)に作用して、該フコース硫酸含有多糖を低分子化させる。

(a) 構成糖：ウロン酸を実質的に含有しない。

(b) フラボバクテリウム (Flavobacterium) sp. SA-0082 (FERM BP-5402) の生産するフコイダン分解酵素により実質上低分子化されない。

このフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドとしては、アルテロ

モナス *sp.* SN-1009 が産生するエンド型フコース硫酸含有多糖分解酵素があり、該酵素は参考例 1-(3) 記載のように調製することができる。

上記のフコース硫酸含有多糖-F は、参考例 1 に記載のように調製することができる。

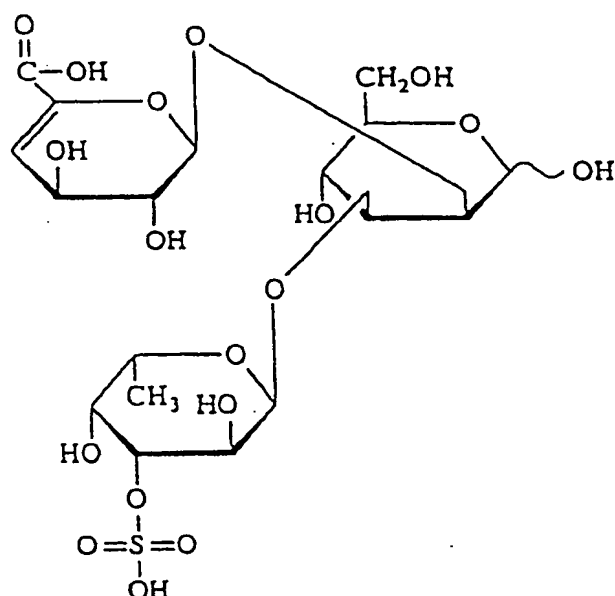
またフラボバクテリウム *sp.* SA-0082 (FERM BP-5402) の生産するフコイダン分解酵素は参考例 5 記載のように調製することができる。

フコース硫酸含有多糖分解活性を有する他のポリペプチドとしてはフラボバクテリウム属細菌由来の下記 (2) のフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドが例示される。

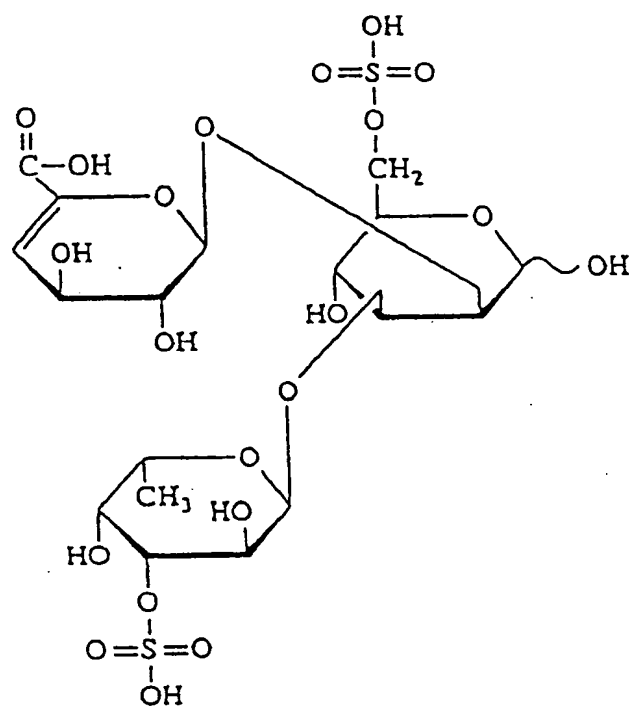
(2) 下記理化学的性質を有するフコース硫酸含有多糖 (以下、フコース硫酸含有多糖-U と称す) に作用して、該フコース硫酸含有多糖を低分子化し、下記式〔I〕、〔II〕、〔III〕及び〔IV〕から選択される少なくとも 1 以上の化合物を遊離させる。

(c) 構成糖：ウロン酸を含有する。

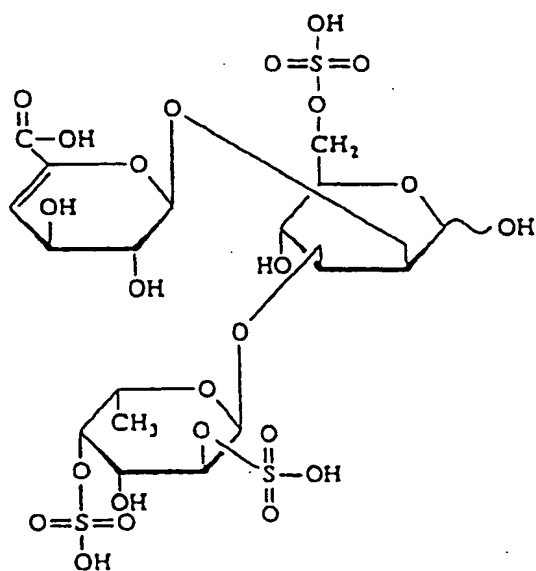
(d) フラボバクテリウム *sp.* SA-0082 (FERM BP-5402) の生産するフコイダン分解酵素によって分解される。



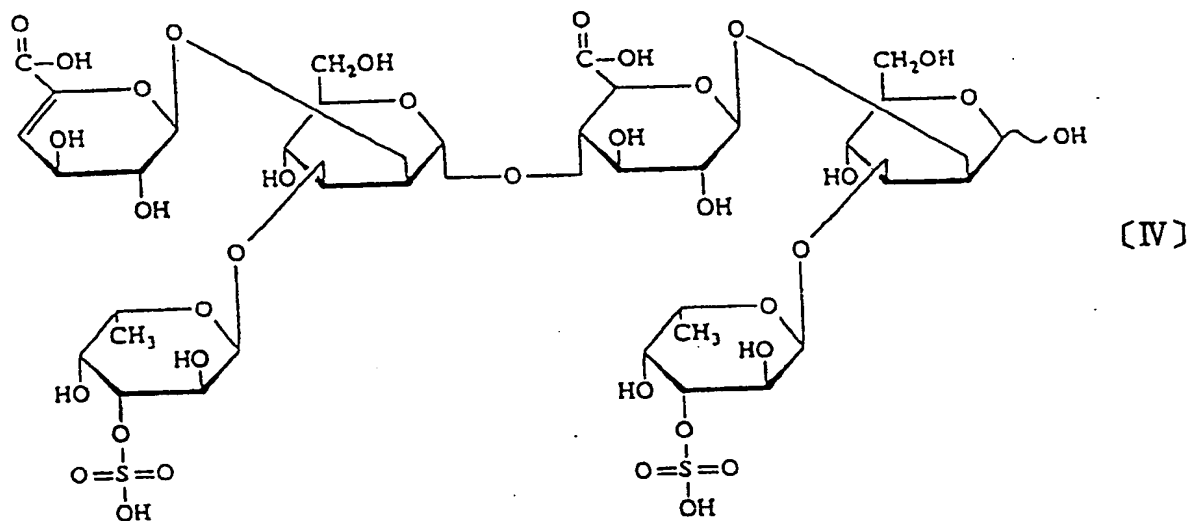
〔I〕



(II)



(III)



このフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドとしてはフラボバクテリウム *sp.* SA-0082 が産生するフコイダン分解酵素があり、該酵素は参考例5記載のように調製することができる。

なおフコース硫酸含有多糖-F、フコース硫酸含有多糖-Uの混合物は、フコース硫酸含有多糖混合物と以下記載する。

本発明においてフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドとは、天然型のフコース硫酸含有多糖分解酵素のみならず、フコース硫酸含有多糖分解活性を有する限り天然型のアミノ酸配列においてアミノ酸の欠失、置換、挿入、付加等によりアミノ酸配列が改変されたポリペプチドをも本発明に含む意味である。

また、ここで言う天然型フコース硫酸含有多糖分解酵素としては、例えばアルテロモナス属細菌、フラボバクテリウム属細菌由来のものが挙げられるが、本発明においてはこれに限定されるものではなく、その他の細菌類はもちろん、酵母類、糸状菌類、子囊菌類、担子菌類等の微生物由来のもの、あるいは植物、動物等の生物体由来のものも含まれる。

本明細書において、機能的に同等の活性を有するポリペプチドとは、以下のようなものをいう。

天然に存在するタンパク質にはそれをコードする遺伝子の多型や変異のほかに、生成後のタンパク質の生体内及び精製中の修飾反応などによって、そのアミノ酸配列中にアミノ酸残基の欠失、付加、挿入、置換等の変異が起こりうるが、それにも関わらず変異を有しないタンパク質と実質的に同等の生理、生物学的活性を示すものがあることが知られている。このように構造的に差異があっても、その機能については大きな違いが認められないものを機能的に同等の活性を有するポリペプチドと呼ぶ。

人為的にタンパク質のアミノ酸配列に上記のような変異を導入した場合でも同様であり、この場合は更に多種多様の変異体を作製することが可能であるが、変異を有しないものと実質的に同等の生理活性を示す限り、これらの変異体は機能的に同等の活性を有するポリペプチドと解釈される。

例えば、大腸菌で発現されたタンパク質のN末端に存在するメチオニン残基は、多くの場合、メチオニンアミノペプチダーゼの作用により除去されるとされているが、タンパク質の種類によってはメチオニン残基を持つもの、持たないものの両方が生成される。しかしながら、このメチオニン残基の有無はタンパク質の活性には影響を与えない場合が多い。また、ヒトインターロイキン2 (IL-2) のアミノ酸配列中の、あるシステイン残基をセリンに置換したポリペプチドがインターロイキン2活性を保持することが知られている〔サイエンス (Science)、第224巻、1431頁(1984)〕。

更に、遺伝子工学的にタンパク質の生産を行う際には、融合タンパク質として発現させることがしばしば行われる。例えば、目的のタンパク質の発現量を増加させるために、目的のタンパク質のN末端に他のタンパク質由来のN末端ペプチド鎖を付加したり、目的タンパク質のN末端、あるいはC末端に適当なペプチド鎖を付加して発現させ、この付加したペプチド鎖に親和性を持つ担体を使用することにより、目的タンパク質の精製を容易にすることなどが行われている。

また、目的のタンパク質のアミノ酸配列に1個もしくは複数個のアミノ酸残基を欠失、付加、挿入、若しくは置換の少なくとも1つを行ったポリペプチドも目的のタンパク質と機能的に同等の活性を有する場合が少なくないが、このような

ポリペプチド及び該ポリペプチドをコードする遺伝子も、天然由来の単離されたものであれ人為的に作製されたものであれ、本発明に包含される。

一般に遺伝子上でアミノ酸を指定するコドン（3つの塩基の組合せ）は、アミノ酸の種類ごとに1～6種類ずつが存在することが知られている。したがって、アミノ酸配列をコードする遺伝子はそのアミノ酸配列にもよるが、多数存在することができる。遺伝子は自然界において決して安定に存在しているものではなく、その核酸に変異が起こることはまれではない。遺伝子上に起こった変異がコードされるアミノ酸配列には変化を与えない場合（サイレント変異と呼ばれる）もあり、この場合には同じアミノ酸配列をコードする異なる遺伝子が生じたといえる。したがって、ある特定のアミノ酸配列をコードする遺伝子が単離されても、それを含有する生物が継代されていくうちに同じアミノ酸配列をコードする多種類の遺伝子ができていく可能性は否定できない。

また、同じアミノ酸配列をコードする多種類の遺伝子を人為的に作製することは、種々の遺伝子工学的手法を用いれば困難なことではない。

例えば、遺伝子工学的なタンパク質生産において、目的のタンパク質をコードする本来の遺伝子上で使用されているコドンが、使用している宿主中では使用頻度の低いものであった場合、タンパク質の発現量が低いことがある。このような場合には、コードされているアミノ酸配列に変化を与えることなく、コドンを宿主で繁用されているものに人為的に変換することにより、目的のタンパク質の高発現を図ることが行われている。このように特定のアミノ酸配列をコードする遺伝子を、人為的に多種類作製することが可能なことは言うまでもない。したがって、これらの人為的に作製された異なるポリヌクレオチドであっても、本発明に開示されたアミノ酸配列がコードされている限り、本発明に包含されるものである。

また、機能的に同等の活性を有するポリペプチドは、それをコードする遺伝子が相同性を有することが多い。したがって、本発明に用いる遺伝子と厳密な条件においてハイブリダイズすることができ、フコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子も本発明に含まれる。

以下、アルテロモナス *s p.* SN-1009及びフラボバクテリウム *s p.* SA-0082を例として本発明を具体的に説明する。

このアルテロモナス *s p.* SN-1009は、*Alteromonas s p.* SN-1009と表示され、平成8年2月13日（原寄託日）より、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所〔日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305-8566）〕に、FERM BP-5747として国際寄託されている。またフラボバクテリウム *s p.* SA-0082は、*Flavobacterium s p.* SA-0082と表示され、前記通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に、FERM BP-5402として国際寄託されている。

アルテロモナス *s p.* SN-1009又はフラボバクテリウム *s p.* SA-0082が産生するフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を取得するには、例えば、ハイブリダイゼーション法やPCR法、あるいはこれらを組合わせた方法を利用することができる。これらの方法には該遺伝子にハイブリダイズ可能なプローブ、あるいはPCR法によって該遺伝子またはその一部を増幅可能なプライマーが必要であるが、これらの菌株の産生するフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドのアミノ酸配列や遺伝子構造は全く知られていないため、プローブあるいはプライマーとして利用可能な合成オリゴヌクレオチドを作製することができない。そこでまず、上記微生物の産生するフコース硫酸含有多糖分解酵素の部分アミノ酸配列を決定し、プローブあるいはプライマーとして利用可能な合成オリゴヌクレオチドの作製を検討する。

まず、例えばアルテロモナス *s p.* SN-1009又はフラボバクテリウム *s p.* SA-0082を培養し、次いでその培養物から、産生されたフコース硫酸含有多糖分解酵素をそれぞれ単離、精製する。

次に、精製された各フコース硫酸含有多糖分解酵素について、その部分アミノ酸配列に関する情報を得る。部分アミノ酸配列を決定するには、例えばフコース硫酸含有多糖分解酵素を直接常法に従ってエドマン分解法によるアミノ酸配列分析（例えばプロテインシーケンサ476A、アプライド バイオシステムズ社製、を用いることができる）に供することにより、フコース硫酸含有多糖分解酵素

のN末端アミノ酸配列を決定する。あるいは、精製フコース硫酸含有多糖分解酵素に、特異性の高い蛋白質加水分解酵素、例えばアクロモバクター (Achromobacter) プロテアーゼI、N-トシル-L-フェニルアラニルクロロメチルケトン (TPCK) -トリプシン等を作用させて限定加水分解を行い、得られたペプチド断片を逆相系HPLCを用いて分離、精製した後、精製ペプチド断片についてアミノ酸配列分析を行えば、多くのアミノ酸配列情報が得られる。

こうして得られるフコース硫酸含有多糖分解酵素に特異的な部分アミノ酸配列に関する情報を選択し、該情報をもとに塩基配列の縮重したオリゴヌクレオチドをデザインし合成する。このとき縮重の程度が低く長いオリゴヌクレオチド、言換えれば、フコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子に特異性の高いオリゴヌクレオチドを合成することが必要であり、オリゴヌクレオチドのデザインがフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子のクローニングに重要な要因となる。

次にサザンハイブリダイゼーション法によって合成オリゴヌクレオチドとフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子との特異的ハイブリダイゼーションの条件を検討する必要がある。

例えば、アルテロモナス sp. SN-1009又はフラボバクテリウム sp. SA-0082のゲノムDNAを適当な制限酵素で完全消化し、アガロースゲル電気泳動で分離後、常法に従いナイロン膜等にブロッティングする。ハイブリダイゼーションは、まず、例えば6×SSC (1×SSCは、8.77gの塩化ナトリウム及び4.41gのクエン酸ナトリウムを1リットルの水に溶解した物)、1%ラウリル硫酸ナトリウム (SDS)、100μg/mlのサケ精子DNA、5×デンハルツ (ウシ血清アルブミン、ポリビニルピロリドン、フィコールをそれぞれ0.1%の濃度で含む) を含むプレハイブリダイゼーション溶液中65℃で数時間保温してナイロン膜をブロッキングした後、例えば³²P等でラベルした合成オリゴヌクレオチドを加えて42℃で一晩保温する。このナイロン膜を0.1%SDSを含む1×SSCで42℃、30分間洗浄した後、オートラジオグラフィーをとって合成オリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイズするDN

A断片を検出する。このとき、用いた合成オリゴヌクレオチドの長さやフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子との相補性によって、保温温度や洗浄溶液の塩濃度等を検討し最適条件を選ぶのが効果的である。

このようにして検出されたフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA断片を得る方法としては、直接検出されたバンドの位置に相当するDNA断片をゲルから抽出、精製した後、通常用いられる宿主-ベクター系のベクターに組込んだライブラリーを作製し、サザンハイブリダイゼーション法と同様の条件でコロニーハイブリダイゼーション、あるいはブラークハイブリダイゼーションを行って、目的のDNA断片を含むクローンをスクリーニング、単離すればよい。あるいは直接アルテロモナス *sp.* SN-1009又はフラボバクテリウム *sp.* SA-0082のゲノムDNAを適当な制限酵素で消化後、通常用いられる宿主-ベクター系のベクターに組込んだライブラリーを作製し、同様にハイブリダイゼーション法で目的のDNA断片を含むクローンをスクリーニング、単離してもよい。

用いられる宿主-ベクター系としては公知のものが使用でき、例えば大腸菌を宿主としたpUC18、pUC19などのプラスミドベクター、あるいはラムダファージなどのファージベクター等が挙げられるが、特にこれらに限定されるものではない。

これら宿主-ベクター系の種類や取扱い方法は一般に用いられる種類や方法を用いれば良く、例えば、モレキュラー クローニング ア ラボラトリー マニュアル 第二版 (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition) [J. サムブルーク (J. Sambrook) ほか著、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー 1989年発行] に記載されている。

目的のDNA断片を含むベクターが選別できれば、このベクターに挿入されている目的のDNA断片の塩基配列は通常の方法、例えばジデオキシ法 [プロシーディングズ オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンス オブ ザ U S A (Proc. Nat. Acad. Sci, U.S.A.)、第74巻、第5463頁 (197

7)) により決定することができる。決定された塩基配列をフコース硫酸含有多糖分解酵素のN末端分析、部分アミノ酸配列、分子量などと比較することによって、得られたDNA断片中の遺伝子の構造及び該遺伝子がコードするポリペプチドのアミノ酸配列を知ることができる。

また、上記のフコース硫酸含有多糖分解酵素の部分アミノ酸配列をもとに得られたオリゴヌクレオチドを用いてフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を得る方法として、PCR法を用いることができる。中でもカセットDNAを用いたPCR法は、短時間で少ないアミノ酸配列情報からハイブリダイゼーション法に使用可能な目的遺伝子の断片を得る方法である。

例えば、フラボバクテリウム sp. SA-0082 の培養菌体から常法にしたがって抽出したゲノムDNAを適当な制限酵素で消化した後、既知の配列を有する合成DNA（カセットDNA）を連結する。この混合物を鋳型として、上記の部分アミノ酸配列の情報をもとにデザインした該遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプライマーとカセットDNAに相補的なオリゴヌクレオチドプライマー（カセットプライマー）とを用いてPCR反応を行い目的のDNA断片を増幅することが可能である。カセットDNAあるいはカセットプライマーについては例えば宝酒造社製のものを利用することができる。カセットDNAは、2種類のカセットプライマーに対応する配列を含んでいるものが好ましく、まず連結した制限酵素サイトから遠い方のプライマーを用いて1回目のPCR反応を行い、その反応液の一部を鋳型としてさらに内側のプライマーを用いて2回目のPCR反応を行うと効果的である。さらに、該遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプライマーについても、並んで2種類をデザイン、合成し、上流のプライマーを1回目のPCR反応に用い、2回目のPCR反応では下流のプライマーを用いると該遺伝子の特異性が高くなり、目的DNA断片の特異的な増幅の可能性が高くなる。

しかしながら、目的の遺伝子の塩基配列は不明であるため、カセットDNAの連結に用いた制限酵素サイトが部分アミノ酸配列をコードする領域からPCRによる増幅反応に適当な位置にあるとは限らない。そのため、多くの種類の制限酵素サイトのカセットDNAを用いてみる必要がある。また、PCRは、例えばP

CRテクノロジー〔PCR Technology、エルリッヒ (Erlich H.A.) 編集、ストックトンプレス社、1989年発行〕に記載されているような、一般に用いられている条件で行うことができるが、用いた合成オリゴヌクレオチドの長さやフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子との相補性によって、アニーリング温度、サイクル数、マグネシウム濃度、耐熱性ポリメラーゼ濃度等を検討し、非特異的な増幅バンドが最も少なくなるような最適条件を選ぶ必要がある。

PCR反応液は、アガロースゲルなどの電気泳動に共し、増幅したDNA断片を確認する。これら断片は、常法に従って抽出、精製し、通常に用いられるpUC18、pUC19などのクローニングベクターに挿入後、例えばジデオキシにより塩基配列を解析することができる。あるいは回収した増幅DNA断片を、PCR反応に用いたカセットプライマーを用いて直接塩基配列を解析してもよい。その結果、プライマーの配列以外に、先に決定したフコース硫酸含有多糖分解酵素の部分アミノ酸配列をコードしているものが得られれば、該酵素をコードする遺伝子あるいはそれにホモロジーを示す遺伝子の断片が得られたことになる。

このようにしてサザンハイブリダイゼーション法あるいは、PCR法により得られたDNA断片が目的の酵素をコードする遺伝子の一部であった場合には、該DNA断片をプローブとしたハイブリダイゼーションによるゲノムライブラリーのスクリーニングを行なうか、あるいは該DNA断片の塩基配列をもとにして作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとしたPCRを行なうことにより、目的の酵素をコードする遺伝子の全長を含むDNA断片を取得することができる。

さらに上述のように得られたフコース硫酸含有多糖分解酵素遺伝子あるいは、その一部をプローブとしてアルテロモナス sp. SN-1009 又はフラボバクテリウム sp. SA-0082 のゲノムDNAをサザンハイブリダイゼーション法によって解析すれば、検出されたバンドの位置から、フコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むアルテロモナス sp. SN-1009 又はフラボバクテリウム sp. SA-0082 のゲノムDNA制限酵素断片サイズの情報が得られ、また、検出されたバンドの数によって、フコー

ス硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子およびそれに相補性を示す遺伝子の数が予想され、これら遺伝子を含むDNA断片は、前述と同様の方法により単離することができる。

このようにして得られたDNA断片が目的の酵素をコードする遺伝子を含むかどうかは、最終的に単離された該DNA断片を含む発現ベクターを作製し、該ベクターを用いて宿主の形質転換を行い、次いでこの形質転換体の培養を行い、発現されたポリペプチドのフコース硫酸含有多糖分解活性を測定することにより確認することができる。

本発明においてはアルテロモナス *sp.* SN-1009より、配列表の配列番号1及び配列番号2でそれぞれ表されるアミノ酸配列を有し、フコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有する遺伝子が単離された。配列番号1及び配列番号2でそれぞれ表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする塩基配列の例を、配列表の配列番号5及び配列番号6にそれぞれ示す。

またフラボバクテリウム *sp.* SA-0082より、配列表の配列番号3及び配列番号4でそれぞれ表されるアミノ酸配列を有し、フコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有する遺伝子が単離された。配列番号3及び配列番号4でそれぞれ表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする塩基配列の例を、配列表の配列番号7及び配列番号8にそれぞれ示す。

本発明の遺伝子の塩基配列を用いて、フコース硫酸含有多糖分解活性又は機能的に同等の活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子をハイブリダイゼーションにより得る方法としては、例えば以下の方法が適用できる。

まず目的の遺伝子源から得た染色体DNA、あるいはmRNAより逆転写酵素により作製したcDNAを常法に従いプラスミドやファージベクターに接続して宿主に導入し、ライブラリーを作製する。そのライブラリーをプレート上で培養し、生育したコロニー又はプラークをニトロセルロースやナイロンの膜に移し取り、変性処理によりDNAを膜に固定する。この膜を例えば³²P等で標識したプ

ローブ（使用するプローブとしては、配列表の配列番号 1～4 のいずれかで表されるアミノ酸配列、又はその一部をコードする塩基配列であればよく、例えば、配列表の配列番号 5～8 のいずれかで表される塩基配列、又はその一部を使用することができる）を含む溶液中で保温し、膜上の DNA とプローブとの間でハイブリッドを形成させる。例えば DNA を固定化した膜を、 $6 \times \text{SSC}$ 、 $1\% \text{SDS}$ 、 $100 \mu\text{g/ml}$ のサケ精子 DNA、 $5 \times \text{デンハルツ}$ を含む溶液中で 65°C で 20 時間、プローブとハイブリダイゼーションを行う。ハイブリダイゼーション後、非特異的に吸着したプローブを洗い流した後、オートラジオグラフィー等によりプローブとハイブリッド形成したクローンを同定する。この操作をハイブリッド形成したクローンが単一になるまで繰り返す。こうして得られたクローンの中には、目的のポリペプチドをコードする遺伝子が挿入されている。

得られた遺伝子は、例えば次のように塩基配列を決定し、得られた遺伝子が目的のフコース硫酸含有多糖分解活性又は機能的に同等の活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子であるかを確認する。

塩基配列の決定は、形質転換体がプラスミドで形質転換された大腸菌であれば試験管等で培養を行い、プラスミドを常法に従い抽出する。これを制限酵素により切断し挿入断片を取出し、M13 ファージベクター等にサブクローニングし、ジデオキシ法により塩基配列を決定する。組換え体がファージベクターが用いられた場合も基本的に同様のステップにより塩基配列を決定することができる。これらの培養から塩基配列決定までの基本的な実験法については、例えば、モレキュラー クローニング ア ラボラトリー マニュアル 第二版〔J. サンプルーク ほか著、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー 1989 年発行〕等に記載されている。

得られた遺伝子が目的のフコース硫酸含有多糖分解活性又は機能的に同等の活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子であるかどうかを確認するには、決定された塩基配列あるいはそのコードしているアミノ酸配列を本発明の配列表の配列番号 5～8 のいずれかで表される塩基配列あるいは配列表の配列番号 1～4 のいずれかで表されるアミノ酸配列と比較する。

得られた遺伝子がフコース硫酸含有多糖分解活性又は機能的に同等の活性を有するポリペプチドをコードする領域のすべてを含まない場合には、得られた遺伝子を基にして合成DNAプライマーを作製し、PCRにより足りない領域を増幅したり、得られた遺伝子の断片をプローブとして、更にDNAライブラリー又はcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、本発明の遺伝子にハイブリダイズするフコース硫酸含有多糖分解活性又は機能的に同等の活性を有するポリペプチドの全コード領域の塩基配列を決定することができる。

一方、本発明の遺伝子の塩基配列からPCR反応用のプライマーをデザインすることができる。このプライマーを用いてPCR反応を行うことによって本発明の遺伝子と相同性の高い遺伝子断片を検出したり、更にはその遺伝子全体を得ることもできる。

次に得られた遺伝子を発現させ、フコース硫酸含有多糖分解活性を測定し、得られた遺伝子の機能を確定する。

本発明のフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を用いてフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドを生産するには、以下の方法が便利である。

まず、目的のフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むベクターを用いて宿主の形質転換を行い、次いでこの形質転換体の培養を通常用いられる条件で行うことによって、フコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドを産生させることができる。このとき該ポリペプチドは封入体 (inclusion body) の形で産生されることもある。宿主としては微生物、動物細胞、植物細胞等の培養細胞を用いることができる。

発現の確認は、例えばフコース硫酸含有多糖分解活性を測定することにより行うのが便利である。活性測定は、例えば組換え体大腸菌の細胞抽出液を酵素液として測定することができる。

目的のフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドの発現が認められた場合は、例えば形質転換体が大腸菌であれば、培地組成、培地のpH、培養温度、インデューサーの使用量・使用時期、培養時間等につき、最適条件を決定す

ることによって効率よくフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドを生産させることができる。

形質転換体の培養物からフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドを精製するには通常の方法が用いられる。形質転換体が大腸菌の場合のように細胞内にフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドが蓄積するときは、培養終了後遠心分離によって形質転換体を集め、これを超音波処理などによって破碎した後、遠心分離等によって、無細胞抽出液を得る。これより、塩析や、イオン交換、ゲルろ過、疎水、アフィニティーなどの各種クロマトグラフィー等の一般的なタンパク質精製法を使用して目的のポリペプチドを精製することができる。用いる宿主ベクター系によっては発現産物が形質転換体外に分泌される場合があるが、この場合は培養上清から同様に精製を行えばよい。

形質転換体が産生するフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドは、それが菌体内に産生されるときは菌体内の諸酵素が共存するが、これらはフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドの量に比べ微量に過ぎないため、その精製は極めて容易である。さらに、宿主として用いる細胞を選べば、フコース硫酸含有多糖に作用する宿主由来の酵素は、大幅に低減される。また、フコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドが菌体外に分泌される場合は、培地成分等が共存するが、これらは容易にフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドと分離できる。

また、例えば宿主が大腸菌の場合、発現産物が不溶性の封入体として形成されることがある。この場合、培養終了後遠心分離によって菌体を集め、これを超音波処理などによって破碎した後、遠心分離等を行うことにより封入体を含む不溶性画分を集める。封入体を洗浄した後、通常用いられるタンパク質可溶化剤、例えば尿素やグアニジン塩酸塩等で可溶化し、必要に応じてこれをイオン交換、ゲルろ過、疎水、アフィニティーなどの各種クロマトグラフィーを行うことにより精製した後、透析法あるいは希釈法などを用いたりホールディング操作を行うことによって活性を保持した目的のフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドを得ることができる。必要に応じてこの標品を更に各種クロマトグラフィー

一によって精製すれば、高純度のフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドを得ることができる。

なお、フコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドと機能的に同等の活性を有するポリペプチドを生産する場合も同様の生産方法、精製方法を用いればよい。

このように本発明により、フコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドの一次構造及び遺伝子構造が提供される。また、フコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチド又はその活性と機能的に同等の活性を有するポリペプチドの遺伝子工学的な製造が可能となる。

本発明の遺伝子工学的製造法を用いれば安価に高純度なフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチド又はその活性と機能的に同等の活性を有するポリペプチドを得ることが可能となる。

以上、フコース硫酸含有多糖分解酵素を産生するアルテロモナス属細菌又はフラバクトリウム属細菌を培養してフコース硫酸含有多糖分解酵素を生産する方法は、同時にプロテアーゼや他の多糖分解酵素が生産されるため、目的のフコース硫酸含有多糖分解酵素を単離するためには、極めて厄介なこれら酵素との分離精製が必要であり、また、酵素の生産を誘導するために培養時に培地に高価なフコース硫酸含有多糖を添加しフコース硫酸含有多糖分解酵素を誘導する必要があったが、本発明により安価に、高純度なフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドの提供が可能となった。

実 施 例

以下、実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

参考例 1

(1) 乾燥ガゴメ昆布 2 Kg を自由粉碎機 M-2 型 (奈良機械製作所製) により粉碎し、4.5 倍量の 80% エタノール中で 80℃、2 時間処理後、ろ過した。残渣に対し、上記 80% エタノール抽出、ろ過という工程を更に 3 回繰返し、エタノール洗浄残渣 1870 g を得た。残渣に 36 リットルの水を加え、100

℃、2時間処理し、ろ過により抽出液を得た。抽出液の塩濃度を400 mMの塩化ナトリウム溶液と同じにした後、5%のセチルピリジニウムクロリドをこれ以上沈殿が生じなくなるまで添加し、遠心分離した。その沈殿を、80%のエタノールで繰返し洗浄し、セチルピリジニウムクロリドを完全に除去した後、3リットルの2 M塩化ナトリウムに溶解し、不溶物を遠心分離で除去し、2 Mの塩化ナトリウムで平衡化した100 mlのDEAE-セルロファインA-800を懸濁し、かくはん後ろ過し、樹脂を除いた。このろ液を、2 Mの塩化ナトリウムで平衡化した100 mlのDEAE-セルロファインA-800のカラムにかけ、素通り画分を限外ろ過器（ろ過膜の排除分子量10万）により脱塩及び低分子除去を行い、この際生じた沈殿を遠心分離により除去した。この上清を凍結乾燥して精製ガゴメ昆布フコース硫酸含有多糖混合物82.2 gを得た。

(2) 上記のガゴメ昆布由来フコース硫酸含有多糖混合物7 gを700 mlの0.2 Mの塩化カルシウムを含む20 mMの酢酸ナトリウム(pH 6.0)に溶解後、あらかじめ0.2 Mの塩化カルシウムを含む20 mMの酢酸ナトリウム(pH 6.0)で平衡化した4000 mlのDEAE-セファロースFFのカラムにかけ、0.2 Mの塩化カルシウムを含む20 mMの酢酸ナトリウム(pH 6.0)で充分カラムを洗浄後、0~4 Mの塩化ナトリウムのグラジエントで溶出した。塩化ナトリウム濃度が0.9~1.5 Mで溶出してくる画分を集め、排除分子量10万の限外ろ過膜を装着した限外ろ過器で濃縮脱塩後凍結乾燥し、フコース硫酸含有多糖-Fの凍結乾燥標品を4.7 g得た。

また塩化ナトリウム濃度が0.05~0.8 Mで溶出してくる画分を集め、排除分子量10万の限外ろ過膜を装着した限外ろ過器で濃縮脱塩後凍結乾燥し、フコース硫酸含有多糖-Uの凍結乾燥標品を2.1 g得た。

(3) アルテロモナス sp. SN-1009 (FERM BP-5747) を、グルコース0.25%、ペプトン1.0%、酵母エキス0.05%を含む人工海水（ジャマリンラボラトリー社製）pH 8.2からなる培地600 mlを分注して殺菌した（120℃、20分）2リットルの三角フラスコに接種し、25℃で25時間培養して種培養液とした。ペプトン200 g、酵母エキス4

g、及び消泡剤（信越化学工業社製KM70）4mlを含む人工海水pH8.0からなる培地18リットルを30リットル容のジャーファーマンターに入れて120℃で20分殺菌した。冷却後、別に120℃、15分殺菌した2リットルの人工海水に溶解した20gの参考例1-(1)の方法を用いて調製したガゴメ昆布由来のフコース硫酸含有多糖-Fを添加し、また上記の種培養液600mlを接種し、24℃で20時間、毎分10リットルの通気量と毎分250回転のかくはん速度の条件で培養した。培養終了後、培養液を遠心分離して菌体及び培養上清を得た。

培養上清中のエンド型フコース硫酸含有多糖分解酵素の活性をフコース硫酸含有多糖-Fを基質に用い、参考例2記載の方法で測定したところ、10mU/ml・培養液であった。

得られた培養上清を、分画分子量1万の限外ろ過器により濃縮後、生じた沈殿を遠心分離により除去し、85%飽和硫酸アンモニウム析出、生じた沈殿を遠心分離により集め、10分の1濃度の人工海水（ジャマリンS）を含む20mMのトリス-塩酸緩衝液（pH8.2）に対して充分透析し、400mlの粗酵素を得た。

得られた粗酵素液を、あらかじめ5mMのアジ化ナトリウム及び10分の1濃度の人工海水（ジャマリンS）を含む20mMのトリス-塩酸緩衝液（pH8.2）で平衡化したDEAE-セルロファインA-800（生化学工業社製）のカラムに吸着させ、吸着物を同緩衝液にて充分洗浄後、同緩衝液中に100mM、200mM、300mM、400mM、及び600mMの塩化ナトリウムを含む溶液で溶出し、活性画分を集めた。

得られた活性画分の酵素活性を参考例2記載の方法で測定したところ、20400mU（20.4U）であった。

得られた活性画分を、分画分子量1万の限外ろ過器により濃縮後、10mMの塩化カルシウム及び50mMの塩化ナトリウムを含む20mMのトリス-塩酸緩衝液pH8.2を添加しながら限外ろ過し、完全に緩衝液を置換した。

得られた酵素溶液を、あらかじめ同緩衝液で平衡化したDEAE-セファロースFFのカラムに吸着させ、吸着物を同緩衝液にて充分洗浄後、塩化ナトリウム

濃度が150 mMの同緩衝液で更に洗浄し、その後150 mMから400 mMの塩化ナトリウムを含む同緩衝液にて塩化ナトリウムのグラジエント溶出を行った。

。

得られた活性画分を集め、限外ろ過で濃縮後、セファクリルS—200によるゲルろ過を行った。溶出液には、5 mMのアジ化ナトリウム及び10分の1濃度のジャマリンSを含む10 mMトリス—塩酸緩衝液pH 8.0を用いた。なお該クロマトグラフィーにより分子量を求めたところ約10万であった。

得られた活性画分を集め、10 mMの塩化カルシウム、10 mMの塩化カリウム、及び4.2 Mの塩化ナトリウムを含む20 mMのトリス—塩酸緩衝液（pH 8.2）に対して充分透析し、あらかじめ塩化ナトリウム濃度が4 Mの同緩衝液で平衡化したフェニルセファロースCL—4Bのカラムにかけ、4 M、3 M、2 M、1 M、0.5 M、及び0.15 Mの塩化ナトリウムを含む同緩衝液にて溶出した。

得られた活性画分を集め、限外ろ過により濃縮後、10 mMの塩化カルシウム、10 mMの塩化カリウム、及び150 mMの塩化ナトリウムを含む20 mMのトリス—塩酸緩衝液（pH 8.2）を添加しながら限外ろ過し、完全に緩衝液を置換した。この酵素液をあらかじめ、同緩衝液にて平衡化したDEAE—セルロファインA—800にかけ、同緩衝液で洗浄後、150 mMから350 mMの塩化ナトリウムのグラジエント溶出を行った。

得られた活性画分を集め、50 mMの塩化ナトリウムを含む同緩衝液にて充分透析後、あらかじめ50 mMの塩化ナトリウムを含む同緩衝液で平衡化したDEAE—セルロファインA—800に吸着させ、同緩衝液で洗浄後、50 mMから150 mMの塩化ナトリウムによるグラジエント溶出を行った。得られた活性画分をまとめて、精製酵素を得た。

また、SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）—ポリアクリルアミド電気泳動により該精製酵素の分子量を求めたところ約9万であった。

参考例2

参考例1—（2）の工程により得られたフコース硫酸含有多糖—Fを用いてエ

ンド型フコース硫酸含有多糖分解活性を下記のように測定した。

すなわち、2.5%のフコース硫酸含有多糖-F溶液12 μ lと、6 μ lの1M塩化カルシウム溶液と9 μ lの4M塩化ナトリウム溶液と、60 μ lの50mMの酢酸とイミダゾールとトリス-塩酸を含む緩衝液(pH7.5)と21 μ lの水と、12 μ lの分解活性測定用被検液とを混合し、30℃、3時間反応させた後、反応液を100℃、10分間処理し、遠心分離後、100 μ lをHPLCにより分析し、低分子化の程度を測定した。

対照として、分解活性測定用被検液の代りに、被検液に使用している緩衝液を用いて同様の条件により反応させたもの及びフコース硫酸含有多糖-F溶液の代りに水を用いて反応を行ったものを用意し、それぞれ同様にHPLCにより分析した。

1単位の酵素は、上記反応系において1分間に1 μ molのフコース硫酸含有多糖-Fのフコシル結合を切断する酵素量とする。切断されたフコシル結合の定量は下記式により求めた。

$$\left\{ (12 \times 2.5) / (100 \times MF) \right\} \times \left\{ (MF/M) - 1 \right\} \times \left\{ 1 / (180 \times 0.01) \right\} \times 1000 = U/ml$$

(12 \times 2.5)/100 : 反応系中に添加したフコース硫酸含有多糖-F (mg)

MF : 基質フコース硫酸含有多糖-Fの平均分子量

M : 反応生成物の平均分子量

(MF/M) - 1 : 1分子のフコース硫酸含有多糖-Fが酵素により切断された数

180 : 反応時間 (分)

0.01 : 酵素液量 (ml)

なお、HPLCの条件は下記によった。

装置 : L-6200型 (日立製作所製)

カラム : OHPak SB-806 (8mm \times 300mm) (昭和電工社製)

溶離液 : 5mMのアジ化ナトリウム、25mMの塩化カルシウム、及び50m

Mの塩化ナトリウムを含む25 mMのイミダゾール緩衝液 (pH 8)

検出: 示差屈折率検出器 (Shodex RI-71、昭和電工社製)

流速: 1 ml/分

カラム温度: 25°C

反応生成物の平均分子量の測定のために、市販の分子量既知のプルラン (STANDARD P-82、昭和電工社製) を上記のHPLC分析と同条件で分析し、プルランの分子量とOHpak SB-806の保持時間との関係を曲線に表し、上記酵素反応生成物の分子量測定のための標準曲線とした。

参考例3

参考例1—(2)の工程で得られたフコース硫酸含有多糖-Uを用いてフコース硫酸含有多糖分解活性を下記のように測定した。

2.5%のフコース硫酸含有多糖-U溶液50 μ lと、10 μ lの分解活性測定用被検液と、60 μ lの667 mM塩化ナトリウムを含む83 mMリン酸緩衝液pH 7.5を混合し、37°C、3時間反応させた後、反応液105 μ lと水2 mlを混合、攪拌し、その230 nmにおける吸光度(AT)を測定する。対照として、分解活性測定用被検液の代りに、被検液に使用している緩衝液のみを用いて同様の条件により反応させたもの、およびフコース硫酸含有多糖-U溶液の代りに水のみを用いて反応を行ったものを用意し、それぞれ同様に吸光度を測定する(AB1およびAB2)。

1単位の酵素は、上記反応系において1分間に1 μ molのマンノースとウロン酸の間のグリコシド結合を脱離的に切断する酵素量とする。切断された結合の定量は、脱離反応の際に生じた不飽和ウロン酸のミリモル分子吸光係数を5.5として計算し行う。なお、酵素の活性は下記式に従って算出した。

$$(AT - AB1 - AB2) \times 2.105 \times 120 / 5.5 \times 105 \times 0.01 \times 180 = U / ml$$

式中、

2.105は吸光度を測定するサンプルの液量(ml)、

120は酵素反応液の液量(μ l)、

5. 5は不飽和ウロン酸の230nmにおけるミリモル分子吸光係数(／mM)

105は希釈に用いる反応液の液量(μl)、

0.01は酵素液量(ml)、

180は反応時間(分)

である。

参考例4

(1) フコース硫酸含有多糖-U及びフコース硫酸含有多糖-Fの分子量をセファクリルS-500を用いたゲルろ過法により求めたところ、各々約19万を中心とした分子量分布を示した。

(2) フコース硫酸含有多糖-U及びフコース硫酸含有多糖-Fの各塩化ナトリウム濃度における、過剰量のセチルピリジニウムクロリド存在下における沈殿形成性を図2に示す。

図2の縦軸は沈殿形成率(%)を示し、横軸は塩化ナトリウム濃度(M)を示す。図中、実線及び白丸はフコース硫酸含有多糖-Uの各塩化ナトリウム濃度での沈殿形成率を示し、図中、点線及び白三角はフコース硫酸含有多糖-Fの各塩化ナトリウム濃度(M)での沈殿形成率を示す。

沈殿形成率の測定は、溶液温度37℃にて、以下のように行った。

フコース硫酸含有多糖-U及びフコース硫酸含有多糖-Fをそれぞれ2%の濃度で水及び4Mの塩化ナトリウムに溶解し、これらを様々な割合で混合することにより様々な濃度の塩化ナトリウムに溶解したフコース硫酸含有多糖-U及びフコース硫酸含有多糖-F溶液を各125μlずつ調製した。次に、セチルピリジニウムクロリドを2.5%の濃度で水及び4Mの塩化ナトリウムに溶解し、それらを混合することにより様々な濃度の塩化ナトリウムに溶解した1.25%のセチルピリジニウムクロリド溶液を調製した。

水に溶解している2%のフコース硫酸含有多糖-U及びフコース硫酸含有多糖-Fを1.25%のセチルピリジニウムクロリドで完全に沈殿させるには容量で3.2倍必要であった。そこで、各濃度の塩化ナトリウムに溶解した2%のフコ

ース硫酸含有多糖-U及びフコース硫酸含有多糖-Fの各125 μ lに対して各々の濃度の塩化ナトリウムに溶解したセチルピリジニウムクロリド溶液を400 μ l添加後、十分かくはんし、30分放置後、遠心分離し上清中の糖含量をフェノール-硫酸法 [アナリティカル ケミストリー (Analytical Chemistry)、第28巻、第350頁 (1956)] により測定し、各塩化ナトリウム濃度下での各フコース硫酸含有多糖の沈殿形成率を算出した。

(3) フコース硫酸含有多糖-Fの成分を以下に示す方法で分析した。

まず、ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (Journal of Biological Chemistry)、第175巻、第595頁 (1948) の記載に従いフコース量を定量した。

フコース硫酸含有多糖-Fの乾燥標品を1規定の塩酸に0.5%の濃度で溶解し、110°Cで2時間処理し、構成単糖に加水分解した。グライコタッグ (GlycoTAG™) 及びグライコタッグ リージェント キット (GlycoTAG™ Reagent Kit) (共に宝酒造社製) を用いて加水分解して得られた単糖の還元性末端をピリジル-(2)-アミノ化 (PA化) し、HPLCにより構成糖の比率を調べた。

次に、アナリティカル バイオケミストリー (Analytical Biochemistry)、第4巻、第330頁 (1962) の記載に従いウロン酸量を定量した。

また、バイオケミカル ジャーナル (Biochemical Journal)、第84巻、第106頁 (1962) の記載に従い硫酸含量を定量した。

このフコース硫酸含有多糖-Fの構成糖はフコース、ガラクトースで、そのモル比は約10:1であった。ウロン酸及びその他の中性糖は実質的に含有されていない。また、フコースと硫酸基のモル比は約1:2であった。

フコース硫酸含有多糖-Uの成分を上記方法に準じ測定した。その結果、フコース硫酸含有多糖-Uの構成糖はフコース、マンノース、ガラクトース、グルコース、ラムノース、キシロース、ウロン酸であった。その他の中性糖は実質的に含有されていない。また、主要成分のフコース:マンノース:ガラクトース:ウロン酸:硫酸基はモル比で約10:7:4:5:20であった。

(4) このフコース硫酸含有多糖-Fの凍結乾燥物の比旋光度を高速・高感度

旋光計 S E P A - 3 0 0 (堀場製作所製) により測定したところ、 -135 度であった。

またフコース硫酸含有多糖-Uの比旋光度は -53.6 度であった。

(5) 1%のフコース硫酸含有多糖-F溶液 16 ml と、5.0 mMのリン酸緩衝液 (pH 8.0) 12 ml と 4 Mの塩化ナトリウム 4 ml と 32 mU/ml の下記参考例 5 に記載のエンド型フコイダン分解酵素溶液 8 ml を混合し、 25°C で 48 時間反応させた。反応による分解物の生成は認められなかった。

上記条件でフコース硫酸含有多糖-Uと参考例 5 に記載のフコイダン分解酵素を 25°C で 48 時間反応させた。反応の進行と共に 230 nm の吸光度が増加することを確認し、本酵素によりフコース硫酸含有多糖-Uが分解されていることが判明した。

参考例 5

参考例 4 記載のフコイダン分解酵素は以下の方法により調製される。該フコイダン分解酵素の生産に用いる菌株としては、該酵素生産能を有する菌株であればいかなる菌株でもよいが、具体例としては例えば、フラボバクテリウム sp. SA-0082 株 (FERM BP-5402) が挙げられる。

本菌株は青森県の海水中より新たに検索して得た菌株で、この菌株は *Flavobacterium* sp. SA-0082 と表示され、平成 7 年 3 月 29 日 (原寄託日) より、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に FERM BP-5402 の受託番号で国際寄託されている。

本菌株の培地に加える栄養源は使用する菌株が利用し、フコイダン分解酵素を生産するものであればよく、炭素源としては例えばフコイダン、海藻粉末、アルギン酸、フコース、グルコース、マンニトール、グリセロール、サッカロース、マルトース、ラクトース、デンプン等が利用でき、窒素源としては、酵母エキス、ペプトン、カザミノ酸、コーンステープリカー、肉エキス、脱脂大豆、硫酸、塩化アンモニウム等が適当である。その他にナトリウム塩、リン酸塩、カリウム塩、マグネシウム塩、亜鉛塩等の無機質、及び金属塩類を加えてもよい。

本フコイダン分解酵素の生産菌を培養するに当り、生産量は培養条件により変

動するが、一般に培養温度は15℃～30℃、培地のpHは5～9がよく、5～72時間の通気かくはん培養で本フコイダン分解酵素の生産量は最高に達する。培養条件は使用する菌株、培地組成等に応じ、本フコイダン分解酵素の生産量が最大になるように設定するのは当然のことである。

本フコイダン分解酵素は菌体中にも培養物上清中にも存在する。

上記のフラボバクテリウム sp. SA-0082株を適当な培地で培養し、その菌体を集め、通常用いられる細胞破壊手段、例えば、超音波処理などで菌体を破碎すると無細胞抽出液が得られる。

次いで、この抽出液から通常用いられる精製手段により精製酵素標品を得ることができる。例えば、塩析、イオン交換カラムクロマト、疎水結合カラムクロマト、ゲルろ過等により精製を行い、純化された本フコイダン分解酵素を得ることができる。

また、上記の培養液から菌体を除去した培養液上清中にも本酵素（菌体外酵素）が大量に存在するので、菌体内酵素と同様の精製手段により精製することができる。

フコイダン分解酵素の精製例を示す。

フラボバクテリウム sp. SA-0082 (FERM BP-5402) をグルコース0.25%、ペプトン1.0%、酵母エキス0.05%を含む人工海水（ジャマリンラボラトリー製）pH7.5からなる培地600mlを分注して殺菌した（120℃、20分）2リットルの三角フラスコに接種し、24℃で24時間培養して種培養液とした。グルコース0.25%、ペプトン1.0%、酵母エキス0.05%、及び消泡剤（信越化学工業製、KM70）0.01%を含む人工海水（ジャマリンラボラトリー製）pH7.5からなる培地20リットルを30リットル容のジャーファーマンターに入れ120℃で20分殺菌した。冷却後、上記の種培養液600mlを接種し、24℃で24時間、毎分10リットルの通気量と毎分125回転のかくはん速度の条件で培養した。培養終了後、培養液を遠心分離して菌体を得た。

この菌体を、200mMの塩化ナトリウムを含む20mMの酢酸－リン酸緩衝

液 (pH 7.5) に懸濁し、超音波破碎後、遠心分離して菌体抽出液を得た。この菌体抽出液中のフコイダン分解酵素の活性を参考例 3 記載の方法で測定したところ、培地 1 ml 中に 5 mU の活性が検出された。なお、活性測定については後に記載する。

本抽出液に、終濃度が 90% 飽和となるように硫酸アンモニウムを加え、かくはん溶解後、遠心分離し、沈殿を上記菌体抽出液と同じ緩衝液に懸濁して、50 mM の塩化ナトリウムを含む 20 mM の酢酸－リン酸緩衝液 (pH 7.5) で十分透析した。透析により生じた沈殿を遠心分離により除去後、あらかじめ 50 mM の塩化ナトリウムを含む 20 mM の酢酸－リン酸緩衝液 (pH 7.5) で平衡化した DEAE－セファロース FF のカラムに吸着させ、吸着物を同緩衝液にて十分洗浄後、50 mM から 600 mM の塩化ナトリウムの直線濃度勾配により溶出させ、活性画分を集めた。次に、この活性画分に終濃度が 4 M となるように塩化ナトリウムを加え、あらかじめ 4 M の塩化ナトリウムを含む 20 mM のリン酸緩衝液 (pH 8.0) で平衡化したフェニルセファロース CL－4B (ファルマシア社製) のカラムに吸着させ、吸着物を同緩衝液で十分洗浄後、4 M から 1 M の塩化ナトリウムの直線濃度勾配により溶出させ、活性画分を集めた。次に、この活性画分を限外ろ過器で濃縮後、あらかじめ 50 mM 塩化ナトリウムを含む 10 mM リン酸緩衝液で平衡化したセファクリル S－300 (ファルマシア社製) でゲルろ過を行い活性画分を集めた。この酵素の分子量をセファクリル S－300 の保持時間から求めたところ約 46 万であった。次にこの活性画分に 25 mM の塩化ナトリウムを含む 10 mM のリン酸緩衝液 (pH 7) で透析した。この酵素液を、あらかじめ 250 mM の塩化ナトリウムを含む 10 mM のリン酸緩衝液 (pH 7) で平衡化したモノ (Mono) Q HR 5/5 (ファルマシア社製) のカラムに吸着させ、吸着物を同緩衝液で十分洗浄後、250 mM から 450 mM の塩化ナトリウムの直線濃度勾配により溶出させ、活性画分を集め、精製酵素を得た。以上の精製工程を表 1 に示す。なお、タンパク質の定量は、酵素液の 280 nm の吸光度を測定することにより行う。その際 1 mg/ml のタンパク質溶液の吸光度を 1.0 として計算する。

表 1

工程	総タンパク量 (mg)	総活性 (ミリ単位)	比活性 (ミリ単位/mg)	収率 (%)
菌体抽出液	61,900	101,000	1.63	100
硫酸塩析	33,800	88,600	2.62	87.7
DEAE-セファロース FF	2,190	40,400	18.4	40.0
フェニルセファロース CL-4B	48.2	29,000	601	28.7
セファクリル S-300	7.24	19,600	2,710	19.4
モノ Q	0.824	15,000	18,200	14.9

また、下記の方法によってもフコイダン分解酵素を精製することができる。

フラボバクテリウム sp. SA-0082 (FERM BP-5402) を、グルコース 0.1%、ペプトン 1.0%、酵母エキス 0.05% を含む人工海水（ジャマリンラボラトリー製）pH 7.5 からなる培地 600 ml を分注して殺菌した（120℃、20分）2 リットルの三角フラスコに接種し、24℃で20時間培養して種培養液とした。ガゴメ昆布由来のフコイダン 0.3%、ペプトン 0.5%、酵母エキス 0.01%、及び消泡剤（信越化学工業製 KM70）0.01% を含む人工海水（ジャマリンラボラトリー製）pH 7.5 からなる培地 20 リットルを 30 リットル容のジャーファーマンターに入れ 120℃で20分殺菌した。冷却後、上記の種培養液 600 ml を接種し、24℃で20時間、毎分 10 リットルの通気量と毎分 125 回転のかくはん速度の条件で培養した。培養終了後、培養液を遠心分離して菌体及び培養液上清を得た。本培養で得られた菌体を、200 mM の食塩を含む 20 mM の酢酸-リン酸緩衝液（pH 7.5）に懸濁し、超音波破碎後、遠心分離して菌体抽出液を得た。この菌体抽出液中のフコ

イダン分解酵素の活性を測定したところ、培地 1 ml 中に 20 mU の活性が検出された。

一方、この培養液上清を限外ろ過（ろ過膜の排除分子量 1 万）（アミコン社製）により濃縮し、フコイダン分解酵素を測定したところ培養液 1 ml 当り 6 mU の活性が検出された。

上記の培養液上清の濃縮液に、終濃度が 90 % 飽和となるように硫酸アンモニウムを加え、かくはん溶解後遠心分離し、沈殿を上記菌体抽出液と同じ緩衝液に懸濁して、50 mM の食塩を含む 20 mM の酢酸－リン酸緩衝液（pH 7.5）で十分透析した。透析により生じた沈殿を遠心分離により除去後、あらかじめ 50 mM の食塩を含む 20 mM の酢酸－リン酸緩衝液（pH 7.5）で平衡化した DEAE－セファロース FF のカラムに吸着させ、吸着物を同緩衝液にて十分洗浄後、50 mM から 600 mM の食塩のグラジエントにより溶出させ、活性画分を集めた。次にこの活性画分に終濃度が 4 M となるように食塩を加え、あらかじめ 4 M の食塩を含む 20 mM のリン酸緩衝液（pH 8.0）で平衡化したフェニルセファロース CL－4 B のカラムに吸着させ、吸着物を同緩衝液で十分洗浄後、4 M から 1 M の食塩のグラジエントにより溶出させ、活性画分を集めた。次にこの活性画分を限外ろ過器（アミコン社製）で濃縮後、あらかじめ 50 mM 食塩を含む 10 mM リン酸緩衝液で平衡化したセファクリル S－200 でゲルろ過を行い活性画分を集めた。次にこの活性画分に終濃度が 3.5 M となるように食塩を加え、あらかじめ 3.5 M の食塩を含む 10 mM リン酸緩衝液（pH 8）で平衡化したフェニルセファロース HP のカラムに吸着させ、吸着物を同緩衝液で洗浄後、3.5 M から 1.5 M の食塩のグラジエントにより溶出させ、活性画分を集めて精製酵素を得た。この酵素の分子量をセファクリル S－200 の保持時間から求めたところ約 7 万であった。

実施例 1

(1) エンド型フコース硫酸含有多糖分解酵素の生産菌株であるアルテロモナス sp. SN－1009 (FERM BP－5747) を、グルコース 0.25 %、ペプトン 1.0 %、酵母エキス 0.05 % を含む人工海水（ジャマリンラボ

ラトリー社製) pH 8.0 からなる培地 500 ml を分注して殺菌した (120 °C、20 分) 2 リットルの三角フラスコに接種し、25 °C で 23 時間培養した。培養終了後、培養液を遠心分離して菌体を集め、その半量の菌体を 10 ml の抽出緩衝液 [50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0)、100 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)] 中に懸濁後、1 ml の抽出緩衝液に溶解した 20 mg / ml のリゾチーム溶液を添加し、氷浴上で 30 分間保温した。次いで、10 ml のプロテイナーゼ K 溶液 [1 mg / ml プロテイナーゼ K、50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0)、100 mM EDTA、1% SDS] を添加した後、50 °C で 2 時間保温した。この後室温に戻し、等容の TE 緩衝液 [10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0)、1 mM EDTA] 飽和フェノールを加えて 1 時間穏やかにかくはんし、10000 rpm で 20 分間遠心した後上層を回収した (以降この操作をフェノール抽出と略す)。

この上層に、等容の TE 緩衝液飽和フェノール/クロロホルム 1 : 1 を加えて穏やかにかくはんし、10000 rpm で 20 分間遠心した後上層を回収した (以降この操作をフェノール/クロロホルム抽出と略す)。再度フェノール/クロロホルム抽出を行った後、水層に 0.1 M となるように塩化ナトリウムを加え更に 2 倍量のエタノールを加えて DNA を析出させガラス棒で巻取った後、80% エタノールでリンスして軽く風乾した。このゲノム DNA を 20 ml の 20 µg / ml のリボヌクレアーゼ A が溶解した TE 緩衝液中に溶解させ、37 °C で 5 時間保温して RNA を分解した。フェノール抽出、フェノール/クロロホルム抽出の後、先と同様にしてエタノール添加後 DNA 回収し、5 ml の TE 緩衝液に懸濁した。以上の操作により、ゲノム DNA 約 20 mg を得た。

(2) 実施例 1 - (1) で調製したゲノム DNA 100 µg を 10 ユニットの制限酵素 Sau3AI と 37 °C で 1 分 40 秒間消化し部分分解後、フェノール/クロロホルム抽出し上層を回収した。上層に 1 / 10 倍容の 3 M 酢酸ナトリウム水溶液 (pH 5.0) 及び 2.5 倍容のエタノールを加えて DNA を沈殿させ、遠心分離により沈殿を回収した後、80% エタノールでリンスして風乾した (以降この操作をエタノール沈殿と略す)。得られた部分分解物を、1.25 - 5 M 塩化ナ

トリウム密度勾配超遠心法によりサイズ分画を行い、10～20 kbpのサイズを含む画分からエタノール沈殿によりDNAを回収した。得られたゲノムDNA部分分解物0.18 μ gとノバジェン (Novagene) 社製ラムダブルースターBamHI アーム (λ Blue STAR BamHI arm) 0.6 μ gと混ぜ、宝酒造社製DNAライゲーションキットを用いて連結させた後、ストラタジーン (Stratagene) 社製ギガパックIIゴールドキット (GigaPack II Gold kit) を用いてラムダファージにパッケージングを行い、アルテロモナス sp. SN-1009のゲノムDNAライブラリーを作製した。

(3) 参考例1-(3)で得たアルテロモナス sp. SN-1009の精製エンド型フコース硫酸含有多糖分解酵素タンパク質200 pmolを、20 mM炭酸水素アンモニウムで平衡化した脱塩用のカラム (ファーストデソルティングカラムPC3.2/10、ファルマシア社製) にアブライ後、同緩衝液で溶出し、緩衝液を置換した。溶出液をガラスバイアルに集め濃縮乾固後、ビリジン10 μ l、4-ビニルビリジン2 μ l、トリ-N-ブチルフォスフィン2 μ l、水10 μ lの入った一回り大きなガラス試験管の中にガラスバイアルごと試料を入れ、ガラス試験管を封管した後、95°Cで10分間反応させてビリジルエチル化した。反応終了後ガラスバイアルを取り出し、数回水と共沸させて揮発性成分を除いた。

得られたビリジルエチル化されたフコース含有多糖分解酵素タンパク質を、40 μ lの8 M尿素を含む10 mMトリス塩酸緩衝液 (pH 9.0)、90 μ lの10 mMトリス塩酸緩衝液 (pH 9.0) 及び0.5 pmolのアクロモバクター (Achromobacter) プロテアーゼI (宝酒造社製) を加え、30°Cで一晩消化し、得られた消化物からペプチド断片をHPLCシステム (スマートシステム、ファルマシア社製) にて精製した。カラムは、 μ RPC C2/C18 SC2.1/10 (ファルマシア社製) を用い、100 μ l/minの流速で行った。溶出は、溶出液として0.12%トリフルオロ酢酸水溶液 (溶出液A) および0.1%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリル (溶出液B) を用い、溶出液Bの割合を0%でサンプルをアブライし、90分間で溶出液Bの割合を55%にまで

あげる直線濃度勾配法にて溶出し、分離精製した。各ペプチド画分についてアミノ酸配列分析を行い、部分アミノ酸配列 F 2 7 (配列番号 9)、F 3 4 (配列番号 10)、F 4 7 (配列番号 11)、F 5 2 (配列番号 12) を決定した。

(4) 実施例 1-(1) で調製したゲノム DNA 20 μ g を制限酵素 BamHI、EcoRI、HindIII、PstI、SacI、SalI、SphI、及び XbaI 各 100 ユニットで各々 37°C で 4 時間消化後、フェノール/クロロホルム抽出した。消化物をエタノール沈殿により回収し、各 10 μ g を更に同じ制限酵素 50 ユニットで各々 37°C で 16 時間消化後、フェノール/クロロホルム抽出し、エタノール沈殿により消化物を回収した。この消化物各 5 μ g を 0.8% アガロースゲル電気泳動に供し、サザンブロット法 (文献: 遺伝子研究法 II、第 218~221 頁、東京化学同人) により、アマシャム社製ナイロン膜 (商品名 ハイボンド N+ (Hybond-N+)) に DNA を転写した。

ハイブリダイゼーションのプロープとしては、実施例 1-(3) で決定した部分アミノ酸配列 F 2 7 (配列番号 9) から混合オリゴヌクレオチド pFDA27 (配列番号 13) を合成し用いた。合成オリゴヌクレオチド 20 pmol をメガラベルキット (MEGALABEL KIT、宝酒造社製) を用いて 32 P で標識した。

上記調製したフィルターを 6×SSC、1% SDS、100 μ g/ml のサケ精子 DNA、5×デンハルツを含む溶液中、65°C で 3 時間プレハイブリダイゼーションを行った後、標識プロープを 0.5 pmol/ml の濃度になるように加え、42°C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション終了後、まず 6×SSC 中室温で 10 分間、1×SSC、0.1% SDS 中室温で 10 分間、1×SSC、0.1% SDS 中、42°C で 30 分間洗浄し、余分な水分を除いた後、富士フィルム社製イメージングプレートに 30 分間露光した後、富士フィルム社製 BAS 2000 イメージングアナライザーにて検出した。

その結果、BamHI、EcoRI 及び SalI 消化物で 23 kbp 以上の位置、HindIII 消化物で約 4.8、1.4、及び 0.3 kbp の位置、PstI 消化物で 23 kbp 以上及び 3.6 kbp の位置、SacI 消化物で 23 kbp 以上及び 9.8 kbp の位置、SphI 消化物で 23 kbp 以上、4.9 kbp、及び 3.0 kbp の位置、

XbaI消化物で約12、5.2、及び3.5 kbpの位置に、それぞれプローブとハイブリダイズするバンドを認めた。

実施例1-(2)で調製したアルテロモナス sp. SN-1009のゲノムDNAライブラリーからフコース硫酸含有多糖分解酵素遺伝子を含むクローンを、ノバジェン社のラムダブルースター取扱説明書に従って、ブランクハイブリダイゼーション法によりスクリーニングした。まず、ファージライブラリーを大腸菌ER1647に感染させ、直径8.5 cmのL培地プレート4枚に、1枚当たり約500個のブランクを形成させた。このプレートにアマシャム社製ナイロン膜〔商品名 ハイボンドN⁺〕を1枚目は約30秒間、2枚目は約2分間接触させ、各プレート2枚ずつファージを写し取った。このナイロン膜を0.5 M水酸化ナトリウム、1.5 M塩化ナトリウムの溶液に浸したろ紙上で5分間変性処理し、次いで、0.5 Mトリス塩酸緩衝液(pH 7.0)、3 M塩化ナトリウムの溶液に浸したろ紙上で5分間中和処理した後、2×SSCでリンスした。このナイロン膜と合成オリゴヌクレオチドpFDA27(配列番号13)を、前述のサザンハイブリダイゼーションと同じ条件でハイブリダイゼーション、洗浄、検出したところ、18個のポジティブシグナルが得られた。元のプレートよりポジティブシグナル付近のブランクをかきとり、SM緩衝液に懸濁し、再度、新しいプレートにブランクを形成させ、同様の操作を繰返すことにより14個のポジティブシグナルを与えるファージを単離した。

ノバジェン社のラムダブルースター取扱説明書に従って、得られた各ファージを大腸菌BM25.8に感染させたのちアンピシリン耐性のコロニーを選択し、ファージをプラスミドの形に変換した。得られた各クローンのコロニーを100 µg/mlのアンピシリンを含むL培地(1%トリプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム)に接種し、37℃で終夜培養した培養液からアルカリ溶菌法によりプラスミドDNAを調製した。このプラスミドDNAを用いて、大腸菌JM109(宝酒造社製)を形質転換し、得られた各クローンのコロニーを100 µg/mlのアンピシリンを含むL培地に接種し、37℃で終夜培養した培養液からアルカリ溶菌法により再度プラスミドDNAを調製した。得られた

各クローンのプラスミドをそれぞれpSFDA1、2、4、5、6、7、8、10、11、12、13、14、16、及びpSFDA17 と命名した。

各プラスミドをそれぞれ、ラムダブルースターベクターのクローニングサイトの両端にある制限酵素NotIで消化し、0.3%アガロースゲル電気泳動により解析したところ、8.4~17.4 kbpの断片が挿入されていることが明らかとなった。また、各プラスミドをそれぞれ制限酵素HindIII で消化し、前述したようにサザンブロッティングの後、合成オリゴヌクレオチドpFDA27（配列番号13）によりハイブリダイゼーションを行って解析を行ったところ、約4.8 kbpのバンドを与えるもの（pSFDA1、及びpSFDA17）、約4.8及び0.3 kbpのバンドを与えるもの（pSFDA5、6、7、11、及びpSFDA13）、約1.4 kbpのバンドを与えるもの（pSFDA10）、約0.3 kbpのバンドとそれ以外のサイズのバンドを与えるもの（pSFDA2、及びpSFDA14）、約4.8 kbpのバンドとそれ以外のサイズのバンドを与えるもの（pSFDA16）、5.0 kbp以上のサイズのバンドを与えるもの（pSFDA4、8、及びpSFDA12）の6つのグループに分けられた。しかし、約1.4 kbpのバンドを与えるpSFDA10 以外は、アガロースゲル電気泳動のエチジウムブロマイド染色でそれぞれ良く似たサイズのバンドが複数検出されることから、各プラスミドにはほぼ同じ位置のゲノムDNAで、約4.8及び0.3 kbpのHindIII 断片あるいはどちらか一方、又はその一部が挿入されていると推定された。また、このpFDA27とハイブリダイズする約4.8及び0.3 kbpのHindIII 断片は、ゲノム上の非常に近接した部分にあると推測された。したがって、得られた14個のプラスミドは、約1.4 kbpのバンドを与えるpSFDA10 とそれ以外のプラスミドに大きくグループ分けされ、ゲノムDNAHindIII 消化物のサザンハイブリダイゼーションで検出された約4.8、1.4、及び0.3 kbpのいずれか、あるいは約4.8及び0.3 kbpの両方を持つことが推測された。得られたプラスミドの中から、約10.2 kbpの挿入断片を持ち、約4.8及び0.3 kbpの両方のHindIII 断片を含むpSFDA7、及び約8.4 kbpの挿入断片を持ち、約1.4 kbpのHindIII 断片を含むpSFDA10 について、数種類の制限酵素で消化後アガロースゲル電気泳動で分析して

制限酵素地図を作製すると共に、合成オリゴヌクレオチドpFDA27とハイブリダイズした領域をプラスミドpUC119などにサブクローニング後、ジデオキシ法によって塩基配列を解析した。pSFDA10 の約1.4 kbpのHindIII 断片中からは、pFDA27の17塩基中14塩基が一致する配列が見出されたが、F27のアミノ酸配列をコードする配列とは一致しないことから、この断片はpFDA27とハイブリダイズするものの、エンド型フコース硫酸含有多糖分解酵素遺伝子とは無関係な断片であると考えられた。一方、pSFDA7の約4.8及び0.3 kbpの両方のHindIII 断片中から、pFDA27の一つの配列と全く一致し、周りの配列も含めて実施例1-(3)で決定した部分アミノ酸配列F27(配列番号9)に一致するアミノ酸をコードする配列が見出された。

また、この約4.8 kbpと0.3 kbpのHindIII 断片は、制限酵素地図上で約3 kbp以上離れており、参考例1-(3)記載のアルテロモナス sp. SN-1009から精製されたエンド型フコース硫酸含有多糖分解酵素のゲルろ過法にて測定される分子量約10万から予想される該酵素遺伝子のサイズより大きいことから、少なくとも2種類の類似した遺伝子があることが予想された。

pSFDA7を導入した大腸菌JM109株を *Escherichia coli* JM109/pSFDA7と表示する。また、pSFDA7を導入した大腸菌JM109株は、*Escherichia coli* JM109/pSFDA7 と表示され、工業技術院生命工学工業技術研究所に平成9年8月1日より FERM P-16362として寄託され、前記工業技術院生命工学工業技術研究所に FERM BP-6340 (国際寄託への移管請求日：平成10年5月6日)として国際寄託されている。

pSFDA7について、更にプライマー伸長法を用いたジデオキシ法によって詳しく塩基配列を解析し、pSFDA7の10.2 kbpの挿入断片の中、8.3 kbpの塩基配列を決定したところ、2646塩基(終止コドンを含む)の読取り枠1(以降、ORF-1と略す)と2445塩基(終止コドンを含む)の読取り枠2(以降、ORF-2と略す)の二つの読取り枠が見出された。ゲノムDNA HindIII 消化物のサザンハイブリダイゼーションで検出された約0.3及び4.8 kbpのHindIII 断片は、正確にはそれぞれ140及び4549塩基対の長さで、それ

それORF-1及びORF-2の一部あるいは全長を含んでいた。ORF-2がコードするアミノ酸配列中に、実施例1-(3)で決定したエンド型フコース硫酸含有多糖分解酵素部分アミノ酸配列F27(配列番号9)と一致する配列以外に、部分アミノ酸配列F34(配列番号10)、F47(配列番号11)、及びF52(配列番号12)と非常に相同性の高い配列が見出された。したがって、ORF-2は、アルテロモナス sp. SN-1009のエンド型フコース硫酸含有多糖分解酵素を実質的にコードしていると考えられる。一方、ORF-1がコードするアミノ酸配列中にも、実施例1-(3)で決定したエンド型フコース硫酸含有多糖分解酵素部分アミノ酸配列F27(配列番号9)と一致する配列以外に、部分アミノ酸配列F34(配列番号10)、及びF52(配列番号12)と相同性の高い配列が見出されたが、部分アミノ酸配列F47(配列番号11)に高い相同性を示す配列は見出されなかった。ORF-1とORF-2のコードするアミノ酸配列を比較すると、ORF-1のN末端付近にORF-2には無い67アミノ酸残基の挿入配列があり、挿入配列以降のアミノ酸配列は70%以上と非常に高い相同性を示すことからORF-1もフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドをコードしていると考えられた。以上のようにして、フコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドをコードすると考えられる遺伝子(ORF-2)及びその遺伝子に非常に高い相同性を示す、フコース硫酸含有多糖分解活性を有すると考えられる新規ポリペプチドをコードする遺伝子(ORF-1)の全塩基配列が決定された。

その結果を図1に示す。すなわち図1は、ORF-1とORF-2の位置を示した図である。図中黒い矢印はORF-1のコード領域及び向きを、図中斜線の矢印はORF-2のコード領域及び向きをそれぞれ示す。また、ORF-1の塩基配列を配列表の配列番号6に、ORF-1がコードするアミノ酸配列を配列表の配列番号2に示す。更にORF-2の塩基配列を配列表の配列番号5に、ORF-2がコードするアミノ酸配列を配列表の配列番号1に示す。

以上、本発明により実質的にエンド型フコース硫酸含有多糖分解酵素をコードすると考えられる遺伝子(ORF-2)及びその遺伝子に相同性を示し、フコー

ス硫酸含有多糖分解活性を有すると考えられる新規ポリペプチドをコードすると考えられる遺伝子 (ORF-1) が単離、精製された。

実施例 2

実施例 1 で得られた、実質的にエンド型フコース硫酸含有多糖分解酵素をコードすると考えられる遺伝子 (ORF-2) の直接発現ベクターを構築するために、ORF-2 の開始コドンを発現ベクター上の至適化された開始コドンと一致させ、ORF-2 の 5' 領域の一部を挿入したプラスミド pEFDA-N を構築した。

まず、合成 DNA、FDA-N1 (配列番号 14) 及び FDA-N2 (配列番号 15) を合成した。FDA-N1 は配列表の配列番号 5 の塩基配列番号 1-13 の配列を含む 15 mer の合成 DNA であり、FDA-N2 は配列表の配列番号 5 の塩基配列番号 4-13 の配列に相補的な配列を含む 15 mer の合成 DNA である。

これら合成 DNA を 0.2 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5)、0.3 M 塩化ナトリウムを含む溶液中で、70°C で 10 分間保温後、室温まで徐冷し二本鎖を形成させ、合成 DNA リンカー FDA-N を調製した。得られた FDA-N は、配列表の配列番号 5 の塩基配列番号 8-13 にある SnaBI サイトを含み、開始コドンのところで NcoI サイトと、SnaBI サイトのすぐ下流で BamHI サイトと連結可能な合成 DNA リンカーである。

一方、T7 プロモーターを使った発現ベクターである pET21d (ノバジェン社製) を、T7 プロモーター下流にある発現のために至適化された開始コドンを含む NcoI サイトと、マルチクロニングサイト内にある BamHI サイトで切断した。この消化物と、先に調製した合成 DNA リンカー FDA-N を DNA ライゲーションキット (宝酒造社製) を用いて連結後、大腸菌 JM109 を形質転換し、100 µg/ml のアンピシリンを含む L 培地プレート上で生育するコロニーを選択した。各形質転換体を 100 µg/ml のアンピシリンを含む L 培地に接種し、37°C 終夜培養後、培養菌体からアルカリ溶菌法によりプラスミド DNA を調製した。プラスミド DNA を SnaBI 消化後 1% アガロースゲル電気泳動を行

い、SnaBI で切断可能なプラスミドを選択し、更にジデオキシ法による挿入断片の塩基配列の確認を行い、p E T 2 1 d のNcoI-BamHIサイトにO R F - 2 の開始コドンからSnaBI サイトまでの領域が挿入されたプラスミドp E F D A - Nを得た。

次に、実施例1で得られたプラスミドp S F D A 7 約5 μ gを30ユニットのSnaBI で37℃、2時間消化後、1%アガロースゲル電気泳動により分離し、O R F - 2 のほぼ全長の領域を含む約2.5 k b p のSnaBI 断片を切出して抽出精製した。このSnaBI 断片を先に構築したプラスミドp E F D A - N のSnaBI 消化物と混ぜ、DNAライゲーションキットを用いて連結後、大腸菌J M 1 0 9 を形質転換し、100 μ g/mlのアンピシリンを含むL培地プレート上で生育するコロニーを選択した。先と同様にしてプラスミドDNAを調製し、SnaBI 消化後1%アガロースゲル電気泳動を行い、2.5 k b p のSnaBI 断片が遊離するプラスミドを選択した。更にジデオキシ法による挿入断片の向きの確認を行い、O R F - 2 がT7プロモーターと同じ向きに挿入されているプラスミドを選択した。こうして得られた、p E T 2 1 d のNcoIサイトにある開始コドンからO R F - 2 の全長が挿入されている発現プラスミドをp E F D A I I 1 0 3 と命名した。

こうして得られたp E F D A I I 1 0 3 を用いて大腸菌B L 2 1 (D E 3) 株(ノバジェン社製)を形質転換した。得られた大腸菌B L 2 1 (D E 3) /p E F D A I I 1 0 3 を100 μ g/mlのアンピシリン及び5 mMの塩化カルシウムを含む5 ml のL培地に接種して37℃で振とう培養し、濁度がO. D. 600 = 0.8の段階で、終濃度1 mMとなるようにI P T Gを加えた後、培養温度を15℃として更に一晩振とう培養を行った。培養終了後、培養液を遠心分離して菌体を集め、細胞破碎用緩衝液〔20 mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.5)、10 mM塩化カルシウム、10 mM塩化カリウム、0.3 M塩化ナトリウム〕1 mlに懸濁し、超音波処理により菌体を破碎した。これを遠心分離して上清を回収し、大腸菌抽出液とした。

対照として、p E T 2 1 d で形質転換した大腸菌B L 2 1 (D E 3) /p E T 2 1 d について同時に同じ条件で培養を行い、大腸菌抽出液を調製し、以下の分

析に用いた。

まず、大腸菌抽出液をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析した結果、大腸菌BL21 (DE3) / pEFDAII103の抽出液中に、大腸菌BL21 (DE3) / pET21dの抽出液では見られない分子量約9万のバンドが観察された。この分子量は、配列表の配列番号1に示したORF-2がコードし得るアミノ酸配列から計算されるポリペプチドの分子量88210とよく一致すると共に、アルテロモナス sp. SN-1009より精製されたエンド型フコース硫酸含有多糖分解酵素のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析した分子量約9万と一致する。以上のように、大腸菌BL21 (DE3) / pEFDAII103がORF-2がコードするポリペプチドを発現していることが確認できた。

次に、大腸菌抽出液のエンド型フコース硫酸含有多糖分解活性を参考例2記載の方法で測定した。

その結果、大腸菌BL21 (DE3) / pEFDAII103の抽出液中から、520 mU/mlのエンド型フコース硫酸含有多糖分解活性が検出された。すなわち、ORF-2がコードするポリペプチドは、フコース硫酸含有多糖分解活性を有し、本発明の遺伝子を持つ大腸菌BL21 (DE3) / pEFDAII103の培養液1 ml中に約104 mUのフコース硫酸含有多糖分解活性を有するORF-2がコードするポリペプチドが生産されていたことが分かる。

一方、大腸菌BL21 (DE3) / pET21dの抽出液からは、エンド型フコース硫酸含有多糖分解活性は全く検出されなかった。

実施例3

ORF-1及びORF-2の開始コドンから15塩基までの配列は全く一致し、その領域内に制限酵素SnaBI サイトがある。すなわち、実施例2で構築したプラスミドpEFDA-N中の挿入配列はORF-1とORF-2で全く同じであるため、このpEFDA-NをORF-1の発現ベクターの構築に用いることができる。

まず、実施例1で得られたプラスミドpSFDA7約5 µgを30ユニットの

SnaBI で 37℃、2 時間消化後、1 %アガロースゲル電気泳動により分離し、ORF-1 のほぼ全長の領域を含む約 3.2 kbp の SnaBI 断片を切出して抽出精製した。この SnaBI 断片をプラスミド pEFDA-N の SnaBI 消化物と混ぜ、DNAライゲーションキットを用いて連結後、大腸菌 JM109 を形質転換し、100 μ g/ml のアンピシリンを含む L 培地プレート上で生育するコロニーを選択した。

実施例 2 と同様にしてプラスミド DNA を調製し、SnaBI 消化後 1 %アガロースゲル電気泳動を行い、3.2 kbp の SnaBI 断片が遊離するプラスミドを選択した。更にジデオキシ法による挿入断片の向きの確認を行い、ORF-1 が T7 プロモーターと同じ向きに挿入されているプラスミドを選択した。こうして得られた、pET21d の NcoI サイトにある開始コドンから ORF-1 の全長が挿入されている発現プラスミドを pEFDAI103 と命名した。

こうして得られた pEFDAI103 を用いて実施例 2 と同様の方法で ORF-1 がコードするポリペプチドの発現とフコース硫酸含有多糖分解活性の確認を行った。

すなわち、まず大腸菌 BL21 (DE3) 株を pEFDAI103 を用いて形質転換した。得られた大腸菌 BL21 (DE3) / pEFDAI103 を 100 μ g/ml のアンピシリン及び 5 mM の塩化カルシウムを含む 5 ml の L 培地に接種して 37℃ で振とう培養し、濁度が O.D. 600 = 0.8 の段階で、終濃度 1 mM となるように IPTG を加えた後、培養温度を 15℃ として更に一晩振とう培養を行った。培養終了後、培養液を遠心分離して菌体を集め、細胞破碎用緩衝液 1 ml に懸濁し、超音波処理により菌体を破碎した。これを遠心分離して上清を回収し、大腸菌抽出液とした。

大腸菌抽出液を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析した結果、大腸菌 BL21 (DE3) / pEFDAI103 の抽出液中に、大腸菌 BL21 (DE3) / pET21d の抽出液では見られない分子量約 10 万のバンドが観察された。この分子量は、配列表の配列番号 2 に示した ORF-1 がコードし得るアミノ酸配列から計算されるポリペプチドの分子量 94910 とよく一致し、大腸

菌BL21 (DE3) / pEFDAI103がORF-1がコードするポリペプチドを発現していることが確認できた。

次に、大腸菌抽出液のエンド型フコース硫酸含有多糖分解活性を参考例2記載の方法で測定した。

その結果、大腸菌BL21 (DE3) / pEFDAI103の抽出液から35.8 mU/mlのエンド型フコース硫酸含有多糖分解活性が検出された。すなわち、ORF-1がコードするポリペプチドはフコース硫酸含有多糖分解活性を有し、本発明の遺伝子を持つ大腸菌BL21 (DE3) / pEFDAI103の培養液1 ml中に、約7.2 mUのフコース硫酸含有多糖分解活性を有するORF-1をコードするポリペプチドが生産されていたことが分かる。

一方、大腸菌BL21 (DE3) / pET21dの抽出液からは、エンド型フコース硫酸含有多糖分解活性は全く検出されなかった。

実施例4.

(1) フコイダン分解酵素の生産菌株であるフラボバクテリウム sp. SA-0082 (FERM BP-5402) を、グルコース0.25%、ペプトン1.0%、酵母エキス0.05%を含む人工海水（ジャマリンラボラトリー社製）pH 8.0 からなる培地500 mlを分注して殺菌した（120℃、20分）2リットルの三角フラスコに接種し、25℃で23時間培養した。培養終了後、培養液を遠心分離して菌体を集め、その半量の菌体を10 mlの抽出緩衝液〔50 mM トリス塩酸緩衝液（pH 8.0）、100 mM エチレンジアミン四酢酸（EDTA）〕中に懸濁後、1 mlの抽出緩衝液に溶解した20 mg/mlのリゾチーム溶液を添加し、氷浴上で30分間保温した。次いで、10 mlのプロテイナーゼK溶液〔1 mg/ml プロテイナーゼK、50 mM トリス塩酸緩衝液（pH 8.0）、100 mM EDTA、1% SDS〕を添加した後、50℃で2時間保温した。この後室温に戻し、等容のTE緩衝液〔10 mM トリス塩酸緩衝液（pH 8.0）、1 mM EDTA〕飽和フェノールを加えて1時間穏やかに攪拌し、10000 rpmで20分間遠心した後上層を回収した。この上層に、等容のTE緩衝液飽和フェノール／クロロホルム1：1を加えて穏やかに攪拌し、1000

0 rpmで20分間遠心した後上層を回収した。再度フェノール／クロロホルム抽出をおこなった後、水層に0.1M となるように塩化ナトリウムを加えさらに2倍量のエタノールを加えてDNAを析出させガラス棒で巻き取った後、80%エタノールでリンスして軽く風乾した。このゲノムDNAを20mlの20μg/mlのリボヌクレアーゼAが溶解したTE緩衝液中に溶解させ、37°Cで5時間保温してRNAを分解した。フェノール抽出、フェノール／クロロホルム抽出の後、先と同様にしてエタノール添加後DNA回収し、5mlのTE緩衝液に懸濁した。以上の操作により、ゲノムDNA約20mgを得た。

(2) 実施例4-(1)で調製したゲノムDNA100μgを10ユニットの制限酵素Sau3AIと37°Cで1分40秒間消化し部分分解させ、フェノール／クロロホルム抽出し上層を回収した。上層に1/10倍容の3M酢酸ナトリウム水溶液(pH5.0)および2.5倍容のエタノールを加えてDNAを沈殿させ、遠心分離により沈殿を回収した後、80%エタノールでリンスして風乾した。得られた部分分解物を、1.25-5M 塩化ナトリウム密度勾配超遠心法によりサイズ分画をおこない、10-20kbpのサイズを含む画分からエタノール沈殿によりDNAを回収した。得られたゲノムDNA部分分解物0.2μgとノバジェン社製ラムダブルースターBamHIアーム0.6μgと混ぜ、宝酒造社製DNAライゲーションキットを用いて連結させた後、ストラタジーン社製ギガバックIIゴールドキットを用いてラムダファージにパッケージングを行い、フラボバクテリウムsp. SA-0082のゲノムDNAライブラリーを作製した。

(3) 参考例5のようにして得られたフラボバクテリウムsp. SA-0082の精製フコイダン分解酵素タンパク質200pmolを、20mM炭酸水素アンモニウムで平衡化した脱塩用のカラム(ファーストデソルティングカラム PC3.2/10、ファルマシア社製)にアプライ後、同緩衝液で溶出し、緩衝液を置換した。溶出液をガラスバイアルに集め濃縮乾固後、ビリジン10μl、4-ビニルビリジン2μl、トリーN-ブチルフォスフィン2μl、水10μlの入った一回り大きなガラス試験管の中にガラスバイアルごと試料を入れ、ガラス試験管を封管した後、95°Cで10分間反応させてビリジルエチル化した。反応終了

後ガラスバイアルを取り出し、数回水と共沸させて揮発性成分を除いた。

得られたビリジルエチル化されたフコイダン分解酵素タンパク質を、 $40\mu\text{l}$ の 8M 尿素を含む 10mM トリス塩酸緩衝液 ($\text{pH } 9.0$)、 $90\mu\text{l}$ の 10M トリス塩酸緩衝液 ($\text{pH } 9.0$) 及び 0.5pmol のアクロモバクター プロテアーゼ I (宝酒造社製) を加え、 30°C で一晩消化し、得られた消化物からペプチド断片をHPLCシステム (スマートシステム、ファルマシア社製) にて精製した。カラムは、 $\mu\text{RPC C}2/\text{C}18\text{ SC}2.1/10$ (ファルマシア社製) を用い、 $100\mu\text{l}/\text{min}$ の流速で行った。溶出は、溶出液として 0.12% トリフルオロ酢酸水溶液 (溶出液A) および 0.1% トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリル (溶出液B) を用い、溶出液Bの割合を 0% でサンプルをアプライし、 80 分間で溶出液Bの割合を 55% にまであげる直線濃度勾配法にて溶出し、溶出液Bの割合が 27% 以上で溶出されるピークとして溶出画分L27、L31、およびL36等を得た。さらに、分離のよくなかった溶出液Bの割合が $17\sim 27\%$ の画分を集めて、濃縮し、同じHPLCシステムに添加後、溶出パターンを 87 分間で溶出液Bの割合を 15% から 40% にまであげる直線濃度勾配にて溶出し、溶出画分LR8、LR9、LR14、およびLR16等を得た。得られた各ペプチド画分についてアミノ酸配列分析を行い、部分アミノ酸配列L27 (配列番号16)、L36 (配列番号17)、LR9 (配列番号18)、LR14 (配列番号19)、およびLR16 (配列番号20) を決定した。

(4) 実施例4-(1)で調製したゲノムDNA $2.4\mu\text{g}$ を制限酵素EcoRI、HindIII、MunI、SpeI、XbaI、および Sau3AI各 30 ユニットで各々 37°C で 3 時間消化後、フェノール/クロロホルム抽出した。消化物をエタノール沈殿により回収した。この各消化物約 $0.5\mu\text{g}$ を、EcoRIおよび MunI消化物にはEcoRIカセット、HindIII消化物にはHindIIIカセット、SpeIおよびXbaI消化物にはXbaIカセット、およびSau3AI消化物にはSau3AIカセット (各カセットDNAはいずれも宝酒造社製) 各 20ng (Sau3AIカセットは 200ng) と混合後、宝酒造社製DNAライゲーションキットを用いて連結させた。反応物をエタノール沈殿により回収して $10\mu\text{l}$ の水に溶解し、カセットDNAを用いたPCR法の鋳型DNA

とした。

一方、実施例 4 - (3) で決定した部分アミノ酸配列 LR 14 (配列番号 19) の 1 ~ 6 のアミノ酸配列から pL14F17 (配列番号 21)、3 ~ 11 のアミノ酸配列から pL14F26 (配列番号 22) の混合オリゴヌクレオチドをそれぞれアミノ酸配列と同じ向きに合成した。

先に調製した鋳型 DNA 各 1 μ l、カセットプライマー C1 (宝酒造社製) 20 pmol、混合オリゴヌクレオチド pL14F17 (配列番号 21) 100 pmol、および滅菌水を加えて 22 μ l とし、94 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱後急冷した。ここに 10 μ l の 10 倍濃度 Ex タック増幅用緩衝液 (宝酒造社製)、16 μ l の 1.25 mM dNTP 混合液、2.5 ユニットのタカラ Ex タック (Takara Ex Taq、宝酒造社製)、および滅菌水を加えて 100 μ l とし、さらにミネラルオイルを重層した。この混合液を自動遺伝子増幅装置サーマルサイクラー (DNA Thermal Cycler 480、宝酒造社製) による増幅反応に供した。PCR 反応は、94 $^{\circ}$ C で 0.5 分間の変性、45 $^{\circ}$ C で 2 分間のアニーリング、72 $^{\circ}$ C で 3 分間の合成反応のサイクルを 25 サイクル行い、最後 72 $^{\circ}$ C で 7 分間保温して合成を完結させた。

次に、滅菌水で 10 倍希釈した 1 回目の PCR 反応液を 94 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱後急冷したものを鋳型 DNA として 2 回目の PCR 反応を行った。すなわち、10 μ l の熱処理した 1 回目の PCR 反応液、カセットプライマー C2 (宝酒造社製) 20 pmol、混合オリゴヌクレオチド pL14F26 (配列番号 22) 100 pmol、10 μ l の 10 倍濃度 Ex タック増幅用緩衝液、16 μ l の 1.25 mM dNTP 混合液、2.5 ユニットのタカラ Ex タック、および滅菌水を加えて 100 μ l とし、さらにミネラルオイルを重層した。この混合液を 94 $^{\circ}$ C で 0.5 分間の変性、55 $^{\circ}$ C で 2 分間のアニーリング、72 $^{\circ}$ C で 3 分間の合成反応のサイクルを 25 サイクル行い、最後 72 $^{\circ}$ C で 7 分間保温して合成を完結させた。また同時に、それぞれの反応液に対してカセットプライマー C2 のみあるいは混合オリゴヌクレオチド pL14F26 のみの反応液についても PCR 反応を行い、各プライマーの非特異的増幅産物のコントロールとした。

アガロースゲル電気泳動で反応液を分析し、非特異的増幅産物のコントロールと比較したところ、多くの反応液で複数本の増幅バンドが検出された。これらの中から比較的バックグラウンドが低く、1本のバンドが強く増幅されていたMunI消化物-EcoRIカセットの2回目PCR反応液から約0.7 kbpのバンドを抽出精製した。このDNA断片とpT7ブルー T-ベクター (pT7blue T-Vector、ノバジェン社製) を混合し、DNAライゲーションキットを用いて連結後、大腸菌JM109を形質転換し、100 μ g/mlのアンピシリン、0.004 %のX-Gal及び1 mMのIPTGを含むL培地プレート上で生育する白色コロニーを選択した。各形質転換体を100 μ g/mlのアンピシリンを含むL培地に接種し、37°C終夜培養後、培養菌体からアルカリ溶菌法によりプラスミドDNAを調製し、約0.7 kbpのバンドが挿入されたプラスミドを選択しpT7-Munと命名した。このpT7-Munの挿入配列をジデオキシ法により塩基配列分析を行ったところ、2回目のPCR反応に用いた pL14F26の配列に続いて部分アミノ酸配列LR14 (配列番号19) の12番目以降のアミノ酸配列をコードする領域が見出された。さらに下流には部分アミノ酸配列L27 (配列番号16) と非常に高い相同性を示すアミノ酸配列をコードする領域が見出された。これらのことからこの約0.7 kbpのDNA断片は、フコイダン分解酵素遺伝子の一部であることが明らかとなった。この約0.7 kbpのDNA断片のプライマーpL14F26からEcoRIカセットとの連結点までの配列を配列番号23に示した。

(5) 実施例4-(1)で調製したゲノムDNA 20 μ gずつを制限酵素BamHI、EcoRI、HindIII、PstI、SacI、SalI、SphI、およびXbaI各100ユニットで各々37°Cで4時間消化後、フェノール/クロロホルム抽出した。消化物をエタノール沈殿により回収し、各10 μ gをさらに同じ制限酵素50ユニットで各々37°Cで16時間消化後、フェノール/クロロホルム抽出し、エタノール沈殿により消化物を回収した。この消化物各5 μ gを0.8 %アガロースゲル電気泳動に供し、サザンブロット法により、アマシャム社製ナイロン膜ハイボンドN+にDNAを転写した。

一方、実施例4-(4)で得られたpT7-Mun約4 μ gをベクター由来の

BamHIおよびSphIで消化し、遊離する約0.7 kbpのフコイダン分解酵素遺伝子の一部を含む断片を抽出精製した。このDNA断片をブカベストラベリングキット (BcaBEST Labeling Kit、宝酒造社製) を用いて³²Pで標識し、ハイブリダイゼーションのプロープDNAを調製した。

上記調製したフィルターを6×SSC、1% SDS、100 μg/mlのサケ精子DNA、5×デンハルツを含む溶液中、65℃で1時間プレハイブリダイゼーションを行った後、標識プロープを約100万cpm/mlの濃度になるように加え、60℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション終了後、まず6×SSC中室温で10分間、2×SSC、0.1% SDS中室温で10分間、0.2×SSC、0.1% SDS中室温で5分間、さらに0.2×SSC、0.1% SDS中45℃で30分間洗浄し、余分な水分を除いた後、富士フィルム社製イメージングプレートに30分間露光した後、富士フィルム社製BAS2000イメージングアナライザーにて検出した。

その結果、BamHI、SalIおよびSphI、SalI消化物で23 kbp以上の位置に1本、EcoRI消化物で約8および3 kbpの位置に2本、HindIII消化物で約11および4 kbpの位置に2本、PstI消化物で約12および2.5 kbpの位置に2本、SacI消化物で約10および9.5 kbpの位置に2本、XbaI消化物で約6 kbpの位置に1本のそれぞれプロープと強くハイブリダイズするバンドを認めた。このことから、フラボバクテリウムsp. SA-0082のゲノムDNA上にフコイダン分解酵素遺伝子が2種類あることが強く示唆された。

(6) 実施例4-(2)で調製したフラボバクテリウムsp. SA-0082のゲノムDNAライブラリーからフコイダン分解酵素遺伝子を含むクローンを、ノバジェン (Novagene) 社のラムダブルースター取扱説明書に従って、ブランクハイブリダイゼーション法によりスクリーニングした。

まず、ファージライブラリーを大腸菌ER1647に感染させ、直径8.5 cmのL培地プレート5枚に、1枚当たり約300個のブランクを形成させた。プレートにアマシャム社製ナイロン膜ハイボンドN+を約30秒間接触させファージを写し取った。このナイロン膜を0.5 M水酸化ナトリウム、1.5 M塩化ナト

リウムの溶液中で5分間変性し、次いで、0.5 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.0)、3 M 塩化ナトリウムの溶液中で5分間中和処理し、2×SSCでリンスした後風乾した。このナイロン膜を紫外線照射処理してDNAを固定化後、実施例4-(5)のサザンハイブリダイゼーションと同じ条件でハイブリダイゼーション、洗浄、検出を行った結果、36個のポジティブシグナルが得られた。元のプレートよりポジティブシグナル付近のブランクをかきとり、SM緩衝液に懸濁しファージを回収した。得られたファージ液のいくつかについて、再度新しいプレートにブランクを形成させ、同様の操作を繰り返すことにより9個のポジティブシグナルを与えるファージを単離した。

ノバジェン社のラムダブルースター取扱説明書に従って、得られた各ファージを大腸菌BM25.8に感染させたのち100 µg/mlのアンピシリンを含むL培地プレートに広げ、アンピシリン耐性のコロニーを選択することによりファージをプラスミドの形に変換した。得られた各クローンのコロニーを100 µg/mlのアンピシリンを含むL培地に接種し、37℃で終夜培養した培養液からアルカリ溶菌法によりプラスミドDNAを調製した。このプラスミドDNAを用いて、大腸菌JM109 (宝酒造社製)を形質転換し、得られた各クローンのコロニーを100 µg/mlのアンピシリンを含むL培地に接種し、37℃で終夜培養した培養液からアルカリ溶菌法により再度プラスミドDNAを調製した。得られた各クローンのプラスミドをそれぞれ pSFLA1、5、10、11、12、13、15、17、およびpSFLA18と命名した。

各プラスミドをそれぞれ、制限酵素KpnI、SacI、およびXbaIを適当に組み合わせ消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、前述したようにサザンハイブリダイゼーションを行い、各挿入断片の制限酵素地図を作成して解析した。その結果、アガロースゲル電気泳動のエチジウムブロマイド染色でそれぞれ良く似たサイズのバンドが複数検出されるとともに、SacI 消化によりpT7-Munの約0.7 kb p挿入断片とハイブリダイズするバンドが2本となるpSFLA1、10、12、15、およびpSFLA18の組と、同様にKpnI消化によりpT7-Munの約0.7 kb p挿入断片とハイブリダイズするバンドが2本となるpSFLA5、11、13、およびpSFL

A17の組の2つにグループ分けされることが明らかとなった。さらに、pSFLA5、pSFLA10、および pSFLA17の3つのプラスミドはXbaI消化により約6 k b pの断片を遊離することが明らかとなり、実施例4-(5)のサザンハイブリダイゼーションで検出された約6 k b pのXbaI消化物のバンドは2本のバンドが重なり合っていることが示唆され、フラボバクテリウム s p . S A - 0 0 8 2 のゲノムDNA上にフコイダン分解酵素遺伝子が少なくとも2種類あることが明らかとなった。

そこで各グループのプラスミドからpSFLA10およびpSFLA17を選びさらに挿入断片の解析を行った。すなわち、これらプラスミド約3 μ gをXbaI消化し、遊離する約6 k b pの断片を抽出精製した。これらXbaI断片をそれぞれクロラムフェニコール耐性ベクターである pHS399 (宝酒造社製) のXbaI消化物と混ぜ、DNAライゲーションキット (宝酒造社製) を用いて連結後、大腸菌JM109を形質転換し、30 μ g/mlのクロラムフェニコール、0.004 %のX-Gal、および1 mMのIPTGを含むL培地プレート上で生育する白色コロニーを選択した。各形質転換体を30 μ g/mlのクロラムフェニコールを含むL培地に接種し、37°C終夜培養後、培養菌体からアルカリ溶菌法によりプラスミドDNAを調製し、制限酵素消化後アガロースゲル電気泳動を行って解析した。その結果、pSFLA10 由来の約6 k b p DNAがベクターDNAに対してそれぞれ逆向きに挿入されたpH10X6-1およびpH10X6-2を得た。また同様に pSFLA17由来の約6 k b p DNAが挿入されたpH17X6-7およびpH17X6-11を得た。pH10X6-1が導入された大腸菌JM-109株は、Escherichia coli JM109/pH10X6-1 と表示され、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に平成10年2月24日よりFERM P-16659として寄託され、前記通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-6341 (国際寄託の移管請求日：平成10年5月6日) として国際寄託されている。pH17X6-7が導入された大腸菌JM-109株は、Escherichia coli JM109/pH17X6-7 と表示され、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に平成10年2月24日よりFERM P-16660として寄託され、前記通商産業省

工業技術院生命工学工業技術研究所に F E R M B P - 6 3 4 2 (国際寄託の移管請求日：平成10年5月6日) として国際寄託されている。これらプラスミドについて直接プライマー伸長法によって、あるいは制限酵素消化後サブクローニング等を行ってジデオキシ法によって詳しく塩基配列を解析したところ、pSFLA10由来の約6 k b pのDNA断片から2094塩基(終止コドンを含む)の読み取り枠が、pSFLA17由来の約6 k b pのDNA断片から2115塩基(終止コドンを含む)の読み取り枠がそれぞれ見いだされ、これら読み取り枠がコードするアミノ酸配列中に実施例4-(3)で決定した部分アミノ酸配列と非常に高い相同性を示す領域が見出された。

pSFLA10由来の読み取り枠を f d l A、pSFLA17由来の読み取り枠を f d l B とそれぞれ命名した。

その結果を図3及び図4に示す。すなわち図3はpSFLA10内のf d l Aの位置を示す図であり、図4はpSFLA10内のf d l Bの位置を示す図である。図3中の黒い矢印はf d l Aのコード領域及び向きをそれぞれ示し、図4中の黒い矢印はf d l Bのコード領域及び向きをそれぞれ示す。

f d l Aがコードするアミノ酸配列中には、実施例4-(3)で決定したフコイダン分解酵素部分アミノ酸配列L36(配列番号17)およびLR14(配列番号19)と一致する配列が、また、部分アミノ酸配列L27(配列番号16)、LR9(配列番号18)およびLR16(配列番号20)と非常に相同性の高い配列が見いだされた。さらに、実施例4-(3)でLR8と命名されたペプチド画分は、各サイクル2つのアミノ酸誘導体がアミノ酸配列分析で検出され、一義的にアミノ酸配列が決定されていなかったが、f d l Aがコードするアミノ酸配列中の2カ所の配列を当てはめることにより各サイクルで検出されたアミノ酸誘導体が説明できることから、この画分にはこの2カ所の配列を含むペプチドが入っていたことが明らかとなった。それぞれの配列をLR8-1(配列番号24)およびLR8-2(配列番号25)と命名した。このようにf d l Aがコードするアミノ酸配列は、実施例4-(3)のフコイダン分解酵素部分アミノ酸配列分析により明らかとなった全てのアミノ酸配列と一致あるいは高い相同性を示す

ことから、フラボバクテリウム *sp.* SA-0082 のフコイダン分解酵素を実質的にコードしていると考えられる。

一方、fdlB がコードするアミノ酸配列中にも、フコイダン分解酵素部分アミノ酸配列 LR14 (配列番号 19) および LR8-1 (配列番号 24) と一致する配列が、また、部分アミノ酸配列 LR27 (配列番号 16)、LR16 (配列番号 20)、および LR8-2 (配列番号 25) と相同性の高い配列が見いだされたが、部分アミノ酸配列 LR36 (配列番号 17) および LR9 (配列番号 18) に高い相同性を示す配列は見いだされなかった。しかし、fdlA と fdlB を比較すると塩基配列およびアミノ酸配列の相同性は各々約 67% および約 56% と高いことから fdlB もフコイダン分解活性を有するポリペプチドをコードしていると考えられた。以上のようにして、フコイダン分解活性を有するポリペプチドをコードすると考えられる遺伝子 (fdlA) およびその遺伝子に非常に高い相同性を示す遺伝子 (fdlB) の全塩基配列が決定された。fdlA の塩基配列を配列表の配列番号 7 に、fdlA がコードするアミノ酸配列を配列表の配列番号 3 に示す。更に fdlB の塩基配列を配列表の配列番号 8 に、fdlB がコードするアミノ酸配列を配列表の配列番号 4 に示す。

以上、本発明により実質的にフコイダン分解酵素をコードすると考えられる遺伝子 (fdlA) およびその遺伝子に相同性を示し、フコース硫酸含有多糖分解活性を有すると考えられる新規ポリペプチドをコードすると考えられる遺伝子 (fdlB) が単離、精製された。

実施例 5.

まず、実施例 4 で得られた、実質的にフコイダン分解酵素をコードすると考えられる遺伝子 (fdlA) の直接発現ベクターを構築した。

実施例 4 で得られたプラスミド pH10X6-1 は、pSFLA10 由来の約 6 kb の XbaI 断片が fdlA 遺伝子及びベクター上の lac プロモーターと向かい合う向きに挿入されていた。この pH10X6-1 を fdlA 遺伝子内部の SacI で消化し、さらに fdlA 遺伝子の開始コドンの位置にある BspHI で消化後、1% アガロースゲル電気泳動により分離し、fdlA の N 末端領域をコードする約 40

0 b p の DNA 断片を切り出して抽出精製した。

一方、T7 プロモーターを使った発現ベクターである p E T 2 1 d (ノバジェン社製) を、T7 プロモーター下流にある発現のために至適化された開始コドンを含む NcoI サイトと、マルチクローニングサイト内にある SacI サイトで切断後、先に調製した f d l A の N 末端領域をコードする約 4 0 0 b p の BspHI-SacI 断片を挿入し、プラスミド p E F L A 1 0 - N を構築した。

次に、プラスミド p H 1 0 X 6 - 1 を HindIII 消化することにより f d l A 遺伝子内部およびベクター由来の HindIII サイトで切断し、f d l A 遺伝子の終止コドンを含む C 末端領域をコードする約 2 k b p の DNA 断片を切り出して抽出精製した。この断片を先に構築したプラスミド p E F L A 1 0 - N の HindIII 消化物と連結し、f d l A 遺伝子全長が再生する方向に該 2 k b p の HindIII 断片が挿入されたプラスミドを選択した。こうして得られた、p E T 2 1 d の NcoI サイトにある開始コドンから f d l A の全長が挿入されている発現プラスミドを p E F L A 1 0 と命名した。

こうして得られた p E F L A 1 0 を用いて大腸菌 B L 2 1 (D E 3) 株 (ノバジェン社製) を形質転換した。得られた大腸菌 B L 2 1 (D E 3) / p E F L A 1 0 を 1 0 0 μ g / m l のアンピシリンを含む 5 m l の L 培地に接種して 3 7 ° C で振とう培養し、濁度が O . D . 6 0 0 = 0 . 8 の段階で、終濃度 1 m M となるように I P T G を加えた後、培養温度を 1 5 ° C としてさらに一晚振とう培養を行った。培養終了後、培養液を遠心分離して菌体を集め、細胞破碎用緩衝液〔2 0 m M リン酸ナトリウム緩衝液 (p H 7 . 0) 、0 . 3 M 塩化ナトリウム〕0 . 5 m l に懸濁し、超音波処理により菌体を破碎した。この懸濁液の一部をとり大腸菌破碎液とした。さらにこれを遠心分離して不溶物を除き大腸菌抽出液とした。

対照として、p E T 2 1 d で形質転換した大腸菌 B L 2 1 (D E 3) / p E T 2 1 d について同時に同じ条件で培養を行い、大腸菌破碎液および抽出液を調製し、以下の分析に用いた。

まず、大腸菌破碎液を S D S ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析した結果、大腸菌 B L 2 1 (D E 3) / p E F L A 1 0 の破碎液中に、大腸菌 B L 2 1 (

DE3) / pET21dの破碎液中には見られない分子量約 7.6 万のバンドが観察された。この分子量は、配列表の配列番号 3 に示した fd1A がコードし得るアミノ酸配列から計算されるポリペプチドの分子量 75,740 とよく一致するとともに、参考例 5 記載のフラボバクテリウム sp. SA-0082 のより精製されたフコイダン分解酵素のゲル濾過法で分析した分子量約 7 万とよく一致する。以上のように、大腸菌 BL21 (DE3) / pEFLA10 が fd1A がコードするポリペプチドを発現していることが確認できた。

次に、大腸菌抽出液のフコース硫酸含有多糖分解活性を参考例 3 に記載の方法で測定した。

その結果、大腸菌 BL21 (DE3) / pEFLA10 の抽出液中のフコイダン分解活性は 2,300 mU/ml であることが分かった。すなわち、fd1A がコードするポリペプチドはフコイダン分解活性を有し、本発明の遺伝子を持つ大腸菌 BL21 (DE3) / pEFLA10 の培養液 1 ml 中に約 230 mU のフコース硫酸含有多糖分解活性を有する fd1A がコードするポリペプチドが生産されていたことが分かる。

一方、大腸菌 BL21 (DE3) / pET21d の抽出液からは、フコイダン分解活性は全く検出されなかった。

実施例 6.

実施例 4 で得られた、フコース硫酸含有多糖分解活性を有すると考えられる新規ポリペプチドをコードする遺伝子、fd1B の直接発現ベクターを構築した。この fd1B 遺伝子の開始コドンの位置には BspHI の認識配列が存在するが、その上流の配列の影響でメチル化を受けるため、宿主として用いた大腸菌 JM109 から回収したプラスミドは直接 BspHI で消化出来なかった。そこで、PCR 法を用いて増幅した DNA 断片を用いて構築を行った。

実施例 4 で得られたプラスミド pH17X6-7 は、pSFLA17 由来の約 6 kb の XbaI 断片が fd1B 遺伝子及びベクター上の lac プロモーターと同じ向きに挿入されていた。まず、pH17X6-7 を fd1B 遺伝子内部およびベクター由来の KpnI サイトで切断後、セルフライゲーションさせプラスミド pH17X6

—7 Kを構築した。このp H 1 7 X 6 —7 Kを鋳型として、f d l Bのコード領域よりも上流の位置で、f d l Bと同じ向きの合成DNAプライマー1 7 X 6 F 4（配列番号2 6）およびベクターにアニーリング可能なM 1 3プライマーM 4（宝酒造社製）の組でP C R反応を行った。P C R反応は、実施例4—（4）と同様の反応液組成中、9 4 °Cで0.5分間の変性、5 5 °Cで0.5分間のプライマーアニーリング、7 2 °Cで1分間の合成反応のサイクルを2 5サイクル行い、最後7 2 °Cで7分間保温して合成を完結させた。反応液をフェノール／クロロホルム抽出後、増幅した約1 k b pのDNA断片をエタノール沈殿により回収した。この断片をf d l B遺伝子の開始コドンの位置にあるBspHI およびコード領域内にあるMflIサイトで切断した後、3 %アガロースゲル電気泳動により分離し、f d l BのN末端領域をコードする約4 5 0 b pのBspHI-MflI断片を切り出して抽出精製した。

一方、実施例5と同様にT 7プロモーターを使った発現ベクターであるp E T 2 1 dを、NcoI サイトとマルチクローニングサイト内にあるBamHIサイトで切断後、先に調製したf d l BのN末端領域をコードする約4 5 0 b pのBspHI-MflI断片を挿入し、プラスミドp E F L A 1 7 —Nを構築した。

次に、プラスミドp H 1 7 X 6 —7をf d l B遺伝子内部にあるNspVサイトおよびf d l B遺伝子下流にあるEcoRI サイトで切断し、f d l B遺伝子の終止コドンを含むC末端領域をコードする約2 k b pのNspV-EcoRI断片を切り出して抽出精製した。この断片を先に構築したプラスミドp E F L A 1 7 —NのNspV-EcoRI間に挿入した。こうして得られた、p E T 2 1 dのNcoIサイトにある開始コドンからf d l Bの全長が挿入されている発現プラスミドをp E F L A 1 7と命名した。

こうして得られたp E F L A 1 7を用いて実施例3と同様の方法でf d l Bがコードするポリペプチドの発現とフコイダン分解活性の確認を行った。

すなわち、まず大腸菌B L 2 1（D E 3）株をp E F L A 1 7を用いて形質転換した。得られた大腸菌B L 2 1（D E 3）／p E F L A 1 7を1 0 0 μg／m lのアンピシリンを含む5 m lのL培地に接種して3 7 °Cで振とう培養し、濁度

がO.D.600=0.8の段階で、終濃度1mMとなるようにIPTGを加えた後、培養温度を15℃としてさらに一晩振とう培養を行った。培養終了後、培養液を遠心分離して菌体を集め、細胞破碎用緩衝液0.5mlに懸濁し、超音波処理により菌体を破碎した。この懸濁液の一部をとり大腸菌破碎液とした。さらにこれを遠心分離して不溶物を除き大腸菌抽出液とした。

大腸菌破碎液をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析した結果、大腸菌BL21(DE3)/pEFLA17の破碎液中に、大腸菌BL21(DE3)/pET21dの破碎液中には見られない分子量約7.7万のバンドが観察された。この分子量は、配列表の配列番号4に示したfdlBがコードし得るアミノ酸配列から計算されるポリペプチドの分子量76,929とよく一致し、大腸菌BL21(DE3)/pEFLA17がfdlBをコードするポリペプチドを発現していることが確認できた。

次に、大腸菌抽出液のフコイダン分解活性を実施例3に記載の方法で測定した。

その結果、大腸菌BL21(DE3)/pEFLA17の抽出液から480mU/mlのフコイダン分解活性が検出された。すなわち、fdlBがコードするポリペプチドはフコース硫酸含有多糖分解活性を有し、本発明の遺伝子を持つ大腸菌BL21(DE3)/pEFLA17の培養液1ml中に約48mUのフコース硫酸含有多糖分解活性を有するfdlBがコードするポリペプチドが生産されていたことが分かる。

一方、大腸菌BL21(DE3)/pET21dの抽出液からは、フコイダン分解活性は全く検出されなかった。

実施例7.

実施例5および実施例6で得られた、フコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドのフコース硫酸含有多糖-Uへの作用を調べた。

すなわち、50μlの100mMのリン酸緩衝液(pH7.5)、50μlの2.5%のフコース硫酸含有多糖-U、および10μlの4Mの塩化ナトリウムの混合液に、10μlの実施例5あるいは実施例6で得られたフコース硫酸含有多

糖分解活性を有するポリペプチド溶液を添加し、25℃で保持した。反応開始より16、40、および65時間の時点で反応液を分取しHPLCにより反応生成物を分析した。HPLCの条件は下記に依った。

カラム：Shodex SB802.5（昭和電工社製）

カラム温度：25℃

溶離液：5 mMのアジ化ナトリウムを含む50 mMの塩化ナトリウム水溶液

流速：1 ml/分

検出器：示差屈折率検出器（Shodex RI-71 昭和電工社製）

なお、反応生成物としては現在までに下記の構造のものが知られているので、下記の物質を標準物質として使用した。なお、下記の式〔I〕～〔IV〕の物質は、以下の方法で製造したものを用いた。

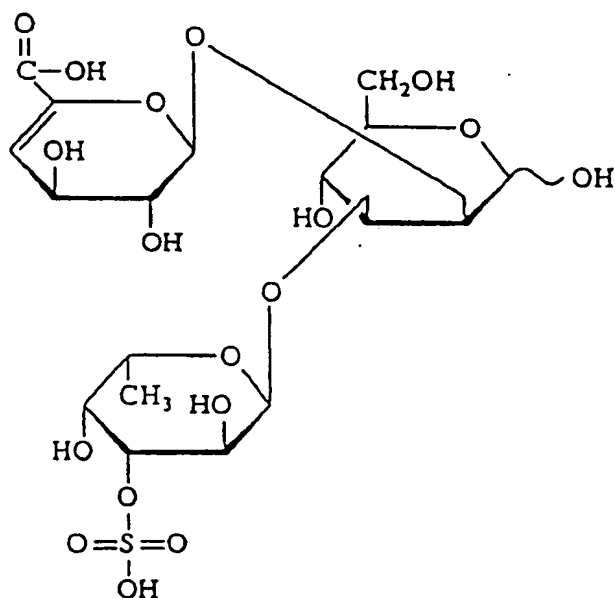
乾燥ガゴメ昆布を自由粉砕機M-2型（奈良機械製作所製）により粉砕し、10倍量の85%メタノール中で70℃、2時間処理後、ろ過した。残渣に20倍量の水を加え、100℃、3時間処理し、ろ過により抽出液を得た。抽出液の塩濃度を400 mMの塩化ナトリウム溶液と同じにした後、5%のセチルピリジニウムクロリドをこれ以上沈殿が生じなくなるまで添加し、遠心分離した。その沈殿を、エタノールで十分洗浄し、セチルピリジニウムクロリドを完全に除去した後、限外ろ過器（ろ過膜の排除分子量10万）（アミコン社製）により脱塩及び低分子除去を行い、この際生じた沈殿を遠心分離により除去した。この上清を凍結乾燥して精製ガゴメ昆布フコイダンを得た。収率は、乾燥ガゴメ昆布粉末重量に対して約4%であった。

次に5%の該精製ガゴメ昆布フコイダン溶液600 mlと、100 mMのリン酸緩衝液（pH 8.0）750 mlと4 Mの塩化ナトリウム150 mlと1750 mU/mlの参考例5記載のフコイダン分解酵素溶液3.43 mlを混合し、25℃で144時間反応させた。反応液をポアサイズ3500の透析膜を用いて透析し、分子量3500以下の画分を集めた。この画分をマイクロアシライザーG3（旭化成社製）により脱塩後、10 mM酢酸アンモニウムで平衡化したDEAE-セファロースFFカラム（4 cm × 25 cm）を用いたイオン交換クロマトグラ

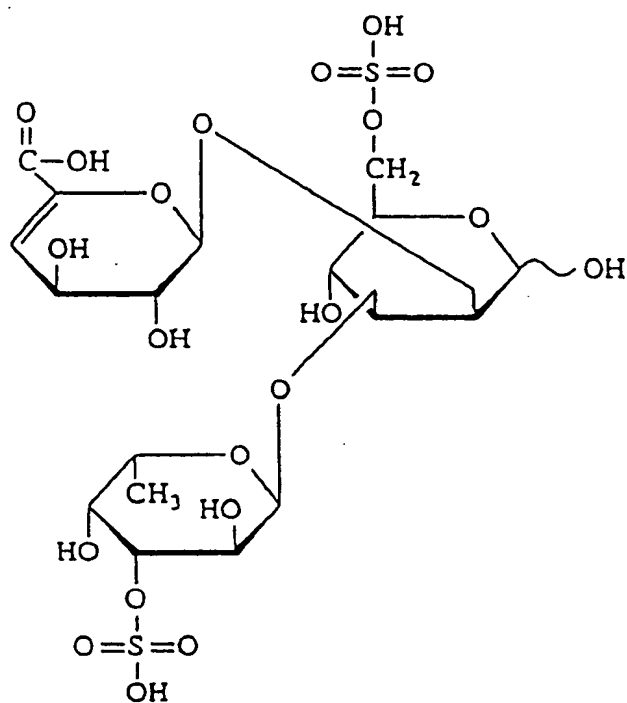
フィーに供した。溶出は、酢酸アンモニウムによる濃度勾配により実施し、溶出液は、50mlずつ分取した。図5に該クロマトグラフィーの溶出を示す。該クロマトグラフィーにより9つの画分(a)～(i)を取得し、その中の(a)、(b)、(c)及び(f)画分を構造解析に使用した。

次に(a)、(b)、(c)、(f)画分について常法に従って構造解析を行い、(a)画分が下記式〔I〕、(b)画分が下記式〔III〕、(c)画分が下記式〔IV〕、(f)画分が下記式〔II〕の化合物である事を確認のうえ、各画分を上記の反応生成物の分析の標準品として使用した。

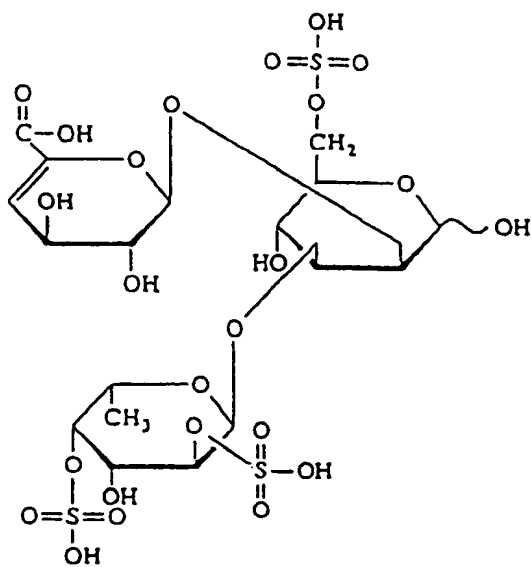
なお上記のDEAE-セファロースFFカラムを用いたイオン交換クロマトグラフィーにおける各画分のフラクションナンバーは、(a):42—43 (b):84—91 (c):51—52 (f):62—63であった。



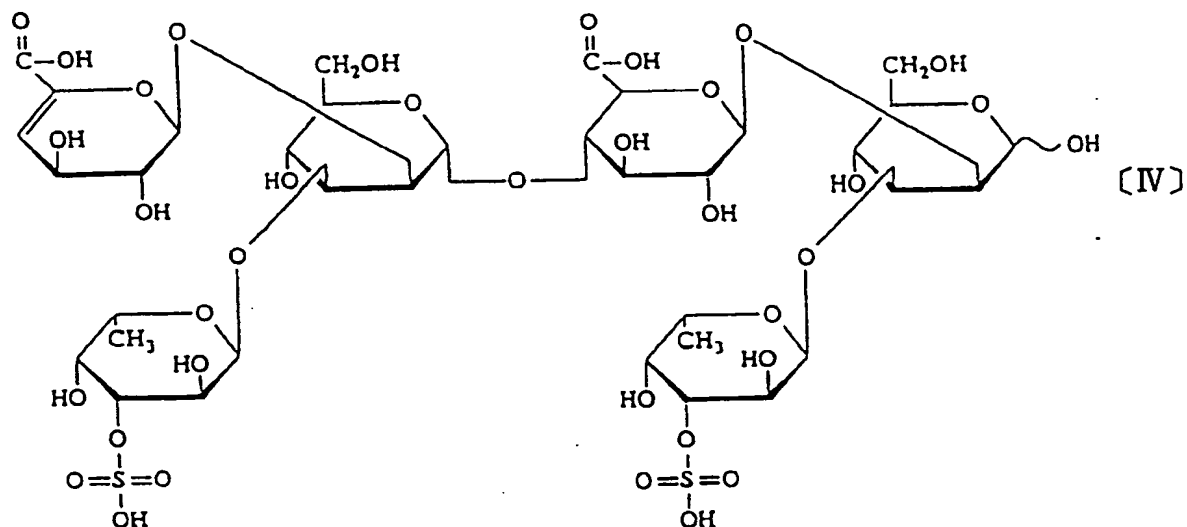
〔I〕



[II]



[III]



上記の反応生成物の分析の結果、実施例 5 で得られたフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドを用いた場合反応生成物は上記〔I〕、〔II〕、および〔III〕のみであったが、実施例 6 で得られたフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドを用いた場合の反応生成物は上記〔I〕、〔II〕、および〔III〕に加えて、〔IV〕が大量に含まれており、その後反応を続けても、〔IV〕は〔I〕に分解されなかった。

すなわち、実施例 5 のようにして得られた f d l A がコードするポリペプチドは、フコース硫酸含有多糖-U に作用して、上記〔I〕、〔II〕、および〔III〕のような 3 糖を最終切断単位として遊離させるが、実施例 6 のようにして得られた f d l B がコードするポリペプチドは、フコース硫酸含有多糖-U に作用して、上記〔IV〕のような 6 糖も最終切断単位として遊離させるものであることが判明した。

実施例 8.

実施例 5 および実施例 6 において、f d l A および f d l B 遺伝子を含むそれぞれの組換え体大腸菌により各遺伝子がコードするポリペプチドが生産され、それら大腸菌抽出液中からフコース硫酸含有多糖分解活性が検出され、f d l A および f d l B がコードするポリペプチドはフコース硫酸含有多糖分解活性を有す

ることが確認された。しかしながら、大腸菌抽出液をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析した結果、大腸菌破碎液と比較してわずかな量の組換え体ポリペプチドしか検出されず、生産されたポリペプチドの一部のみが活性型の可溶性ポリペプチドとして発現されることが示唆された。

フラボバクテリウム *sp.* SA-0082 のフコイタン分解酵素は菌体外分泌酵素であり、膜透過のための分泌シグナルがN末端に付加した前駆体の形で発現されることが予想される。そこで、fdlAおよびfdlBのコードするN末端アミノ酸配列を調べたところ、開始メチオニンからそれぞれ25番目、24番目のアラニン残基までの領域が分泌シグナルと予想された。この疎水的な分泌シグナルの存在が、実施例5および実施例6におけるそれぞれの組換え体ポリペプチドの可溶性と関係があると考えられたので、fdlAおよびfdlBそれぞれの分泌シグナルを除いた発現プラスミドを構築した。

(1) まず、fdlAの開始メチオニンから26番目グルタミン残基の直上流に制限酵素BamHIサイトを導入するためにプライマーFDL-Q-Bam(配列番号27)およびプライマー10X6R4(配列番号28)をデザインし、合成した。FDL-Q-Bamは配列表の配列番号7の塩基配列番号76-95の配列の上流にBamHIサイトを配した28merの合成DNAである。また、10X6R4は配列表の配列番号7の塩基配列番号1471-1491の配列に相補的な21merの合成DNAである。

実施例5で構築したpEFLA10を鋳型として、プライマーFDL-Q-Bamと10X6R4の組でPCR反応を行った。PCR反応は、実施例4-(4)と同様の反応液組成中、94℃で0.5分間の変性、50℃で1分間のプライマーアニーリング、72℃で2分間の合成反応のサイクルを25サイクル行い、最後72℃で7分間保温して合成を完結させた。反応液をアガロースゲル電気泳動により分離後、増幅した約1.4kbpのDNA断片を抽出精製した。この断片を実施例4-(4)と同様の方法で、pT7ブルー T-ベクター(ノバジェン社製)に挿入したプラスミドDNAを調製し塩基配列を確認した。得られたプラスミドをプライマーFDL-Q-Bamに配したBamHIサイトおよびfdlA

コード領域内にあるSnaBI サイトで切断した後、5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、fdlAの開始メチオニンから26番目グルタミン残基以降のN末端領域をコードする約480bpのBamHI-SnaBI断片を切り出して抽出精製した。

一方、実施例5と同様なT7プロモーターを使った発現ベクターであるpET21a（ノバジェン社製）をマルチクローニングサイト内のHindIII サイトで切断し、実施例5で調製したfdlA遺伝子の終止コドンを含むC末端領域をコードする約2kbpのHindIII DNA断片をT7プロモーターとfdlA遺伝子が同じ向きとなるように挿入し、プラスミドpEFDLA-Cを構築した。このpEFDLA-Cをマルチクローニングサイト由来のBamHI サイトおよびfdlAコード領域内にあるSnaBI サイトで切断し、先に調製したfdlAの開始メチオニンから26番目グルタミン残基以降のN末端領域をコードする約480bpのBamHI-SnaBI断片を挿入し、プラスミド pEFDLA101を得た。

この プラスミド pEFDLA101は、T7プロモーターの下流にpET21a由来の14残基のN末端リーダー配列（配列番号29）に続いて配列表の配列番号3の26番目以降の配列がつながったポリペプチドをコードしている。

(2) プライマーFDL-Q-Bamのデザインに用いたfdlAの26番目のグルタミン残基以降の20塩基の配列は、同様にfdlBの25番目のグルタミン残基以降の配列（配列表の配列番号8の塩基配列番号73-92）と一致する。従って、実施例8-(1)で用いたプライマーFDL-Q-BamはそのままfdlB発現ベクターの構築に用いることができ、基本的に実施例8-(1)と同様の方法を用いてfdlB発現ベクターpEFDLB101を構築した。

まず、FDL-Q-Bamを用いてPCR反応を行うために、配列表の配列番号8の塩基配列番号1489-1508の配列に相補的な20merの合成DNA、17X6R1（配列番号30）を作製した。実施例6で構築したpEFLB17を鋳型として、プライマーFDL-Q-Bamと17X6R1の組でPCR反応を行い、増幅した約1.4kbpのDNA断片を抽出精製した。この断片をpT7ブルー T-ベクターに挿入し、プラスミドDNAを調製し塩基配列を確

認した。

次に、得られたプラスミドをプライマーFDL-Q-Bamに配したBamHI サイトおよびfdlBコード領域内にあるNspVサイトで切断した後、5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、fdlBの開始メチオニンから25番目のグルタミン残基以降のN末端領域をコードする約210bpのBamHI-NspV断片を切り出して抽出精製した。

一方、実施例4で得られたプラスミドpH17X6-7をEcoRI サイトで切断し、fdlB遺伝子全長を含む約2.6kbpのEcoRI断片を切り出して抽出精製した。この断片をpET21aをマルチクローニングサイト内のEcoRIサイトに、T7プロモーターとfdlB遺伝子が同じ向きとなるように挿入し、プラスミドpEFDLB-Wを構築した。このpEFDLB-Wをマルチクローニングサイト由来のBamHIサイトおよびfdlBコード領域内にあるNspV サイトで切断し、先に調製したfdlBの開始メチオニンから25番目のグルタミン残基以降のN末端領域をコードする約210bpのBamHI-NspV断片を挿入し、プラスミドpEFDLB101を得た。

このプラスミドpEFDLB101は、T7プロモーターの下流に実施例8-(1)で得たプラスミドpEFDLA101と全く同じ14残基のN末端リーダー配列(配列番号29)に続いて配列表の配列番号4の25番目以降の配列が繋がったポリペプチドをコードしている。

(3) 実施例8-(1)、(2)で得られたpEFDLA101およびpEFDLB101を用いて、実施例5と同様の方法で組換え体の培養、菌体抽出液の調製を行い、実施例5および実施例6で構築したpEFLA10およびpEFLA17による各組換え体ポリペプチドの発現量とフコイダン分解活性の比較を行った。

すなわち、pEFLA10、pEFLA17、pEFDLA101、あるいはpEFDLB101を用いて大腸菌BL21(DE3)株を形質転換した。得られた形質転換体をそれぞれ100 μ g/mlのアンピシリンを含む5mlのL培地に接種して37°Cで振とう培養した。培養液の濁度がO.D.600=0.8の

段階で、終濃度 1 mM となるように IPTG を加えた後、培養温度を 15 °C とし、さらに一晩振とう培養を行った。培養終了後、培養液を遠心分離して菌体を集め、細胞破碎用緩衝液 0.5 ml に懸濁し、超音波処理により菌体を破碎した。この懸濁液の一部をとり大腸菌破碎液とした。さらにこれを遠心分離して不溶物を除き大腸菌抽出液とした。

各大腸菌破碎液および抽出液を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離後、常法に従ってクマシーブリリアントブルー染色を行い解析したところ、いずれの大腸菌破碎液にも予想される分子量のポリペプチドの大量発現が観察された。同時に泳動したウシ血清アルブミン量との比較によりその発現量を見積もるとともに、各抽出液中のフコイダン分解活性を参考例 3 に記載の方法で測定した。これらの結果を表 2 にまとめて記載した。

表 2

プラスミド	遺伝子	培養液 1 l 当たりの 発現蛋白量 (mg/l)		培養液 1 ml 当たりの 活性量 (mU/ml) (抽出液)
		(破碎液)	(抽出液)	
pEFLA10	fdlA	5	1	200
pEFDLA101	fdlA	10	10	1300
pEFLA17	fdlB	35	*	34
pEFDLB101	fdlB	75	75	5700

*検出限界以下により見積不能

表 2 に示されるように、破碎液中に含まれる目的ポリペプチドの発現量は、分泌シグナルと予想される配列の代わりに N 末端リーダー配列が付加するように構築された pEFDLA101 (fdlA)、pEFDLB101 (fdlB) の方が、予想分泌シグナルを持つ直接発現プラスミド pEFLA10 (f

d1A)、EFLA17 (fd1B) と比べていずれの遺伝子の場合も2倍程度の高い生産量を示した。

また、分泌シグナルを持つ場合は抽出液中に存在する目的ポリペプチド量が破碎液と比較して極端に少なくなり、発現されたポリペプチドの多くが不溶性として存在しているのに対し、分泌シグナルを除いた場合は破碎液とほぼ等量の目的ポリペプチドが抽出液中に検出され、発現されたポリペプチドがほとんど可溶性として存在していることが明らかとなった。さらに、抽出液中の活性量も目的ポリペプチドの存在量に対応して大きく上昇した。

実施例9.

実施例2および実施例3で得られた、フコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドのフコース硫酸含有多糖-Fへの作用を調べた。

すなわち、500 μ lの50mM イミダゾール-HCl緩衝液(pH7.5)、50 μ lの参考例1—(2)記載のフコース硫酸含有多糖-F 2.5%溶液、50 μ lの1M塩化カルシウム及び75 μ lの4M塩化ナトリウムの混合液に、100 μ lの実施例2あるいは実施例3で得られた9.7mU/mlのフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチド溶液を添加しさらに蒸留水を加えて全量を1mlにした。25°Cで18時間反応した後、反応生成物をHPLCにより分析した。HPLCの条件は下記によった。

カラム: Shodex SB804 (昭和電気社製)

カラム温度: 25°C

溶離液: 5mMのアジ化ナトリウムを含む50mMの塩化ナトリウム水溶液

流速: 1ml/分

検出器: 示差屈折率検出器 (Shodex RI-71 昭和電気社製)

上記の本発明の遺伝子がコードされるポリペプチドの作用により生成する反応生成物の分析の結果、実施例2及び実施例3で得られたフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドを用いた場合の反応生成物中にはいずれもHPLCのリテンションタイムで8.62分及び9.30分の2つのピークが検出された。

なお実施例 2 で得られたフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドを用いた場合と実施例 3 で得られたフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドを用いた場合を比較すると実施例 2 の方が、9.30 分の物質を多く生成していた。

発 明 の 効 果

本発明によりフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドのアミノ酸配列及び塩基配列が初めて明らかとなり、これによりフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドを提供することが可能になると共に、フコース硫酸含有多糖分解活性を持つポリペプチドの工業的に有利な遺伝子工学的製造方法が提供される。

本発明によれば、フコース硫酸含有多糖分解酵素の誘導生産のために培地にフコース硫酸含有多糖を加える必要が無く、生産性は高い。また、プロテアーゼや他の多糖分解酵素などの酵素が同時に生産されることもなく、精製も容易である。フコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドのアミノ酸配列及び塩基配列が提供されたことにより、アミノ酸配列を基に抗フコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチド抗体を作製することや、塩基配列を基にフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドの塩基配列に特異的なプローブやプライマーを作製することが可能となった。

配 列 表

配列番号 : 1

配列の長さ : 814

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ヘプチド

配列 :

Met	Lys	Ile	Arg	Asn	Val	Cys	Arg	Ser	Ala	Val	Leu	Leu	Gly	Leu
1				5					10					15
Met	Ser	Leu	Asn	Thr	Tyr	Ala	Glu	Thr	Lys	Ala	Asp	Trp	Met	Gln
				20					25					30
Gly	Asn	Trp	Gly	Ile	Ser	Tyr	Arg	Ile	Pro	Gly	Gly	Asp	Ile	Asn
				35					40					45
Tyr	Ser	Gly	Ser	His	Val	Ala	Glu	Tyr	Asn	Val	Arg	Ala	Ala	Val
				50					55					60
Glu	Gln	Ile	Ser	Ala	Ile	Pro	Gly	Leu	Lys	Trp	Val	Gln	Ile	Asn
				65					70					75
Leu	Thr	Asn	Gly	Ala	Ser	Gly	Asp	Arg	Phe	Ile	Val	Pro	Val	Thr
				80					85					90
Glu	Val	Glu	Ala	Ile	Asn	Pro	Leu	Ser	Ala	Pro	Asn	Ser	Ile	Asn
				95					100					105
Asp	Leu	Tyr	Asp	Pro	Thr	Leu	Pro	Gly	Arg	Asp	Leu	Phe	Glu	Gln
				110					115					120
Leu	Ala	Leu	Ala	Phe	Lys	Ala	Lys	Gly	Ile	Arg	Val	Val	Ala	Tyr
				125					130					135
Ile	Ala	Thr	Gln	Gly	Pro	Gly	Met	Leu	Lys	His	Gly	Ala	Glu	Asn
				140					145					150

Ser Met Asp Glu Asp Asp Ser Ile Thr Asp Cys Lys Ser Ser Lys			
	155	160	165
Pro Leu Val Thr Asp Leu Asp Thr Gln Val Tyr Cys Ser Ala Asn			
	170	175	180
Met Asn Arg Trp Arg Asp Tyr Val Leu Glu Gln Tyr Pro Ser Thr			
	185	190	195
Ser Leu Tyr Arg Ser Phe Glu Leu Ala Met Val Asn Ile Val Glu			
	200	205	210
Thr Leu Ser Leu Arg Tyr Gly Ser Thr Ile Asp Gly Trp Trp Phe			
	215	220	225
Asp His Ser Gly Phe Gly Asp Ser Glu Leu Leu His Ala Ala Ala			
	230	235	240
Leu Ala Gly Asn Asn Asp Ala Ala Val Ala Phe Asn Glu Gly Asp			
	245	250	255
Lys Val Pro Leu Val Asn Asn Pro Glu Thr Leu Asp Asp Tyr Thr			
	260	265	270
Phe Gly His Pro Thr Pro Ile Gly Ser Glu Val Ser Ser Asp Asp			
	275	280	285
Lys Asn Leu Pro Met Leu Thr Ser Ile Glu Ala Thr Leu Asp Gly			
	290	295	300
Ile Leu Thr Gly Ser Gly Asp Asp Val Gly Ser Val Gly His Met			
	305	310	315
Phe Met Pro Leu Gln Glu Ser Trp Asn Gly Gly Thr Val Val Phe			
	320	325	330
Ser Glu Ala Lys Gly Ser Asp Trp Leu Asn Arg Ala Leu Lys Ala			
	335	340	345
Gly Gly Ala Phe Thr Trp Ala Leu Ser Gln Asp Ser Asn Asp Glu			
	350	355	360

Leu Gly Gly Gly Gly Ala Arg Leu Ile Ser Glu Pro Gln Val Lys	365	370	375
Met Leu Glu Arg Met Ser Phe Asn Ile Gly Lys Gln Leu His Met	380	385	390
Asn Leu Asp Gly Ser Asp Gly Asp Thr Ala Tyr Asp Asp Ser Val	395	400	405
Asn Gln Tyr Thr Ala Thr Val Asn Gly Ala Asn Phe Val Asp Asp	410	415	420
Val Thr Arg Gly Lys Val Ala Ser Phe Thr Glu Asp Asp Gln Leu	425	430	435
Glu Leu Asp Asn Tyr Gln Gly Ile Ser Gly Gly Asn Ala Arg Thr	440	445	450
Thr Met Ala Trp Ile Lys Thr Ser Asp Ser Lys Gly Asp Ile Ile	455	460	465
Asp Trp Gly Asn Asn Thr Thr Ser Glu Arg Trp Trp Leu Arg Leu	470	475	480
Val Asp Gly Lys Phe Lys Leu Ile Leu Lys Gly Pro Asn Leu Thr	485	490	495
Gly Thr Thr Thr Leu Asn Asp Asp Gln Trp His His Ile Ala Val	500	505	510
Val Ala Ser Asp Asn Val Val Ala Asn Ile Lys Val Tyr Ile Asp	515	520	525
Gly Val Leu Glu Thr Val Ala Val Asn Asp Asn Ala Ser Thr Thr	530	535	540
Phe Asp Thr Thr Leu Gly Gly Asn Ile Gln Ile Gly Gly Ala Tyr	545	550	555
Thr Gly Leu Ile Asp Lys Val Leu Val His Asp Arg Ala Leu Asp	560	565	570

Glu Ser Glu Ile Glu Tyr Val Val Asn Ser Ser Asn Ala Asp Leu		
575	580	585
Asp Leu Glu Val Ala Leu Asp Val Arg Phe Glu Glu Ser Ala Asn		
590	595	600
Ser Thr Lys Val Thr Asp Asn Ser Ile Tyr Gly Arg His Gly Thr		
605	610	615
Asn Arg Gly Ala Ile Thr Gly Val Phe Asp Ala Glu Arg Asn Ser		
620	625	630
Asn Val Tyr Ser Leu Asp Gly Val Asp Ser Gly Glu Asp Ile Asn		
635	640	645
Asp Leu Lys Asp Ser Asp Tyr Glu His Glu Val Val Met Thr Thr		
650	655	660
Asp Asn Ser Lys Asp Ser Lys Gly Tyr Ser Gly Val Asn Gly Ala		
665	670	675
Gly Pro Arg Thr Val Met Ala Trp Ile Lys Thr Thr Phe Gly Gly		
680	685	690
Ala Val Ile Ala Gln Trp Gly Asn Lys Asn Ser Val Asp Gly Glu		
695	700	705
Gln Tyr Glu Val Arg Leu Lys Asn Gly Ala Leu Arg Leu Asp Ile		
710	715	720
Thr Gly Gly Ile Ile Lys Gly Thr Thr Ser Ile Asn Asp Gly Glu		
725	730	735
Trp His His Ile Ala Val Val Ser Pro Asp Glu Gln Leu Ala Asn		
740	745	750
Thr Lys Leu Tyr Val Asp Gly Val Leu Glu Thr Ala Thr Thr Ser		
755	760	765
Gly Ser Gln Ala Thr Ile Asp Thr Lys Thr Leu Asn Gly Asp Ser		
770	775	780

Lys Asp Val Ile Ile Gly Ser Thr Phe Val Gly Glu Met Asp Asp
 785 790 795
 Phe Ile Ile His Gln Arg Ala Leu Arg Gln Phe Glu Val Lys Asn
 800 805 810
 Ser Ala Gly Leu

配列番号 : 2

配列の長さ : 881

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Met Lys Ile Arg Asn Met Cys Cys Thr Ala Leu Ile Val Ser Leu
 1 5 10 15
 Met Gly Cys Gly Gly Ser Gly Ser Glu Ala Ser Ser Pro Glu Val
 20 25 30
 Glu Val Asp Asn Gly Val Glu Ile Gln Pro Glu Pro Glu Val Glu
 35 40 45
 Pro Glu Pro Glu Val Glu Pro Glu Pro Glu Val Glu Pro Glu Pro
 50 55 60
 Glu Val Glu Pro Glu Pro Glu Val Glu Pro Glu Pro Glu Val Glu
 65 70 75
 Pro Glu Pro Glu Val Glu Pro Glu Pro Glu Asp Ile Arg Ala Ser
 80 85 90
 Trp Met Gln Gly Asn Trp Gly Ile Ser Phe Arg Ile Ser Gly Gly
 95 100 105

Asp Ile Ser Gln Asn Glu Ser His Val Asn Glu Tyr Gln Val Ala		
110	115	120
Pro Ala Val Glu Gln Ile Ala Ala Ile Pro Gly Leu Lys Trp Leu		
125	130	135
Gln Val Asn Leu Ser Asn Gly Ala Phe Gly Asp Arg Phe Ile Val		
140	145	150
Pro Val Pro Glu Val Glu Ala Ile Asn Pro Asn Ser Ala Pro Asn		
155	160	165
Ser Ser Ala Asp Leu Phe Asp Pro Ala Leu Pro Gly Asp Asp Leu		
170	175	180
Phe Glu Gln Ile Ala Leu Gly Leu Gln Ala Lys Gly Ile Lys Val		
185	190	195
Val Ala Tyr Ile Ala Thr Gln Gly Pro Ala Met Leu Lys His Gly		
200	205	210
Ala Glu Arg Ser Met Asp Phe Asp Asp Ser Ile Val Asp Glu Ser		
215	220	225
Asp Gly Ser Ala Cys Lys Ser Ser Arg Pro Val Val Ser Asp Pro		
230	235	240
Asp Thr Gln Val Tyr Cys Ser Ala Asn Met Asn Arg Trp Arg Asp		
245	250	255
Tyr Val Leu Gln Gln Tyr Pro Ser Thr Ser Leu His His Ser Phe		
260	265	270
Gln Leu Gly Leu Val Asn Ile Val Glu Thr Leu Ser Leu Arg Tyr		
275	280	285
Gly Thr Leu Ile Asp Gly Trp Trp Phe Asp His Ser Ile Tyr Gly		
290	295	300
Asp Tyr Asn Leu Leu Pro Asp Ala Ala Arg Ala Gly Asn Ser Asn		
305	310	315

Ala Ala Val Ser Leu Asn Leu Glu Gly Asp Ile Phe Leu Ser Asn			
	320	325	330
Asn Pro Glu Val Met Glu Asp Phe Thr Gly Gly His Pro Thr Pro			
	335	340	345
Ile Ala Arg Val Val Ser Ser Asp Asp Thr Asn Leu Pro Met Leu			
	350	355	360
Thr Ala Ile Glu Asp Ala Pro Asn Gly Ile Phe Thr Gly Thr Gly			
	365	370	375
Asp Asp Val Asp Ala Leu Gly His Met Phe Leu Pro Leu Gln Glu			
	380	385	390
Thr Trp Asn Gly Gly Thr Val Val Phe Ser Glu Ala Lys Gly Thr			
	395	400	405
Glu Trp Leu Asn Arg Val Thr Arg Ala Gly Gly Ala Leu Thr Trp			
	410	415	420
Ala Leu Ser His Glu Gly Ser Val Ser Gly Gly Glu Ala Met Leu			
	425	430	435
Ile Ser Ala Pro Gln Ala Lys Met Leu Ala Arg Met Gln Leu Asn			
	440	445	450
Ile Gly Lys Gln Leu Asp Met Asp Leu Asp Gly Ala Asp Gly Ala			
	455	460	465
Thr Ala Tyr Asp Asp Ser Val Asn Gln His Thr Ala Thr Val Thr			
	470	475	480
Gly Ala Thr Phe Ile Asp Asp Val Thr Arg Glu Lys Val Ala Ser			
	485	490	495
Phe Thr Glu Thr Asp Leu Ile Thr Leu Asn Asn Phe Thr Gly Ile			
	500	505	510
Leu Gly Glu Ser Ala Arg Thr Thr Met Ala Trp Ile Lys Thr Ser			
	515	520	525

Asp Ser Asn Ala Asp Val Ile Gln Trp Gly Lys Gln Glu Thr Ser		
530	535	540
Glu Ala Trp Tyr Val Gly Leu Asp Asn Gly Ile Leu Gln Leu Asn		
545	550	555
Ile Gln Gly Ser Thr Val Ile Gly Ala Ser Val Leu Asn Asp Asp		
560	565	570
Ser Trp His His Ile Ala Val Ile Ala Pro Asp Asn Ser Ile Ala		
575	580	585
Asn Thr Gln Val Tyr Ile Asp Gly Val Leu Glu Thr Leu Thr Val		
590	595	600
Asn Asp Gly Gly Ser Ser Thr Phe Asn Thr Val Ala Asp Thr Asn		
605	610	615
Val Val Ile Gly Gly Glu Phe Thr Gly Leu Ile Asp Lys Thr Val		
620	625	630
Val Tyr Asn Arg Ala Leu Glu Glu Ser Glu Ile Asp Tyr Ile Val		
635	640	645
Asn Ser Ala Asp Ala Asp Ile Asp Leu Gly Ile Ser Leu Asp Val		
650	655	660
Arg Phe Asp Glu Asp Ala Asn Ala Thr Thr Val Ala Asp Asn Ser		
665	670	675
Ala Tyr Glu Arg Ser Gly Ile Asn Arg Gly Ala Ile Thr Gly Val		
680	685	690
Phe Asp Ala Thr Arg Asn Ser Asn Val Tyr Ser Leu Asp Gly Val		
695	700	705
Asp Ser Gly Glu Asp Leu Asp Asp Leu Ile Asp Ser Asp Tyr Glu		
710	715	720
His Gln Ile Val Met Thr Thr Asn Asn Lys Arg Asp Asn Lys Gly		
725	730	735

Tyr Ser Gly Val Asn Gly Gly Asp Pro Arg Thr Val Met Ala Trp			
	740	745	750
Ile Lys Thr Thr Phe Gly Gly Ala Val Ile Ala Gln Trp Gly Asn			
	755	760	765
Lys Asp Ser Val Asp Gly Glu Gln Tyr Glu Val Arg Leu Lys Asn			
	770	775	780
Gly Glu Leu Arg Val Asp Ile Thr Gly Gly Leu Ile Lys Gly Thr			
	785	790	795
Thr Leu Ile Asn Asp Gly Glu Trp His His Ile Ala Val Val Ser			
	800	805	810
Pro Asp Asp Gln Leu Ala Asn Thr Lys Leu Tyr Val Asp Gly Val			
	815	820	825
Leu Glu Thr Thr Thr Thr Ser Gly Ser Gln Thr Thr Ile Asp Thr			
	830	835	840
Leu Thr Leu Asn Gly Asp Ser Lys Asp Val Ile Ile Gly Ser Thr			
	845	850	855
Phe Val Gly Glu Met Asp Asn Phe Val Ile His Gln Arg Ala Leu			
	860	865	870
Lys Gln Phe Glu Val Lys Val Ala Ala Gly Ile			
	875	880	

配列番号 : 3

配列の長さ : 697

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Met	Ile	Lys	Lys	Tyr	Asn	Leu	Ile	Lys	Thr	Gly	Val	Ile	Thr	Phe
1				5						10				15
Leu	Val	Leu	Phe	Phe	Gln	Gln	Thr	Tyr	Ala	Gln	Thr	Thr	Thr	Val
				20						25				30
Tyr	Ser	Leu	Glu	Asp	Leu	Leu	Pro	Tyr	Leu	Lys	Gln	Asp	Asn	Val
				35						40				45
Asp	Val	Lys	Leu	Ala	Pro	Gly	Thr	Tyr	Asn	Val	Asn	Gly	Phe	Asp
				50						55				60
Val	Gly	Glu	Asp	Arg	Leu	Phe	Ser	Thr	Thr	Pro	Leu	Phe	Leu	Phe
				65						70				75
Glu	Gly	Ser	Asn	Ser	Thr	Tyr	Asp	Phe	Thr	Asp	Val	Lys	Leu	Asn
				80						85				90
Ile	Asn	Thr	Val	Val	Leu	Thr	Lys	Phe	Gly	Asn	Asn	Glu	Val	Asn
				95						100				105
Glu	Ile	Gln	Ile	Leu	Gly	Asn	Asn	Asn	Val	Leu	Lys	Asn	Leu	Lys
				110						115				120
Leu	Glu	Asp	Ile	Gly	Thr	Thr	Ala	Pro	Ser	Asn	Arg	Ala	Gln	Ser
				125						130				135
Ile	Val	Ile	Asp	Gly	Arg	Asp	Asn	Arg	Ile	Glu	Gly	Phe	His	Leu
				140						145				150
Thr	Ile	Arg	Gly	Ser	Tyr	Pro	Tyr	Gly	Tyr	Gly	Asp	Ala	Phe	Gly
				155						160				165
Lys	Gly	Gly	Gly	Ser	Val	Ile	Asn	His	Arg	Lys	His	Ser	Gly	Val
				170						175				180
Leu	Ile	Arg	Gly	Leu	Arg	Asn	His	Leu	Lys	Asp	Cys	Thr	Ile	Ile
				185						190				195
Ser	Arg	Ser	Tyr	Gly	His	Ile	Val	Phe	Met	Gln	Ala	Ala	Ser	Tyr
				200						205				210

Pro Thr Val Glu Gly Cys Tyr Ile Glu Gly Glu Met Arg Ser Thr		
	215	220 225
Asp Asp Met Leu Ala Glu Glu Gly Thr Gly Ser Pro Ala Asp Lys		
	230	235 240
Val Asp Phe Met Thr Val Trp Gly Tyr Lys Leu Pro Ala Gly Tyr		
	245	250 255
Met Met Ser Leu Gln Glu Gly Gly Ile Arg Ala Tyr Asn Ala Gly		
	260	265 270
Thr Thr Tyr Ile Asp Gly Val Glu Ile Gln Arg Ala Thr Asp Asn		
	275	280 285
Pro Thr Val Leu Asn Cys Thr Ile Lys Asn Ala Arg Thr Gly Val		
	290	295 300
Thr Leu Ala His Ala Asn Gly Thr Lys Tyr Val Glu Gly Cys Thr		
	305	310 315
Val Leu Gly Cys Glu Asn Gly Tyr Ser Ile Gly Ser Gly Thr Val		
	320	325 330
Val Asn Cys Gly Ala Asp Ala Ile Tyr Gly Pro Val Phe Lys Asn		
	335	340 345
Thr Tyr Gly Ser Asp Lys Gly Tyr Asn Ala Asp Ile Thr Ile Leu		
	350	355 360
Pro Pro Ser Asp Ala Tyr Tyr Asn Gly His Asp Ala Val Ala Tyr		
	365	370 375
Ile Gly Gly Ser Asn His Asn Leu Thr Phe Arg Ser Glu Ile Thr		
	380	385 390
Glu Ile Pro Ser Asn Leu Lys Ile Met Val Ser Gly Asp Leu Gln		
	395	400 405
Gly Leu Arg Val Leu His Gly Ser Asn Pro Ser Gln Asn Asn Phe		
	410	415 420

Ala Gly Thr Asn Ile Val Leu Arg Asn Leu Thr Asn Phe Pro Val			
	425	430	435
Asp Leu His Ser Asp Ser Ser Asn Ile Thr Val Thr Ser Cys Asp			
	440	445	450
Thr Asp Asn Ile Thr Asp Asn Gly Thr Asn Asn Ser Ile Glu Ala			
	455	460	465
Ile Asp Cys Asp Ser Asp Asn Leu Ala Leu Lys Gly Glu Ala Ser			
	470	475	480
Gln Ser Ser Ser Arg Pro Ser Asp Gly Phe Ala Ala Asn Ala Ile			
	485	490	495
Asp Gly Asn Thr Asn Gly Ala Trp Ser Asn Asn Ser Val Ser His			
	500	505	510
Thr Gly Thr Glu Glu Asn Pro Trp Trp Gln Val Asp Leu Gly Thr			
	515	520	525
Asp Ala Ile Ile Gly Ser Ile Asn Ile Phe Asn Arg Thr Asp Gly			
	530	535	540
Cys Cys Lys Gly Arg Leu Asp Asn Phe Thr Val Tyr Val Ile Asp			
	545	550	555
Lys Asp Asp Lys Val Thr Phe Ser Lys Thr Tyr Val Thr Val Pro			
	560	565	570
Asp Pro Ser Ile Thr Val Asp Ala Gly Gly Val Asn Gly Lys Ile			
	575	580	585
Val Lys Ile Val Leu Asn Asn Ser Ser Gln Ala Leu Ala Leu Ala			
	590	595	600
Glu Val Glu Val Tyr Gly Thr Ser Leu Ser Asn Lys Glu Thr Ile			
	605	610	615
Lys Asn Pro Ile His Phe Tyr Pro Asn Pro Val Glu Asp Glu Val			
	620	625	630

Thr Ile Ser Leu Glu Ser Ala Asp Leu Asn Leu Asn Glu Thr Arg
 635 640 645
 Val Val Ile Tyr Asn Ile Lys Gly Gln Lys Ile Leu Glu Thr Thr
 650 655 660
 Pro Ser Asn Ser Thr Glu Val Asn Leu Asn Leu Ser His Leu Pro
 665 670 675
 Thr Gly Val Tyr Leu Ile Arg Val Ser Asp Gln Asn Lys Asn Ile
 680 685 690
 Ile Asn Lys Ile Val Lys Leu
 695

配列番号 : 4

配列の長さ : 704

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Met Lys Lys Tyr Ser Ile Leu Lys Ile Gly Ile Ile Ala Val Ile
 1 5 10 15
 Met Leu Phe Val Gln Gln Ser Tyr Ala Gln Thr Thr Thr Val Tyr
 20 25 30
 Ser Leu Glu Asp Leu Leu Pro Tyr Leu Lys Gln Asp Asn Val Asp
 35 40 45
 Val Lys Leu Ala Pro Gly Thr Tyr Asn Ile Asn Ala Phe Asp Ile
 50 55 60
 Thr Gln Gly Lys Phe Ser Asn Pro Leu Phe Leu Phe Glu Gly Ser
 65 70 75

Asn Asn Thr Phe Asp Phe Thr Asp Val Lys Ile Asn Ile Asn Thr		
	80	85 90
Leu Val Leu Thr Lys Phe Gly Asn Asn Glu Val Asn Glu Ile Gln		
	95	100 105
Ile Leu Gly Asn Asn Asn Val Leu Lys Asn Leu Lys Leu Glu Asp		
	110	115 120
Ile Gly Thr Thr Ala Pro Ser Asn Arg Ala Gln Ser Ile Ile Met		
	125	130 135
Asp Gly Arg Asp Asn Arg Ile Glu Gly Phe His Leu Thr Ile Arg		
	140	145 150
Gly Ser Tyr Pro Tyr Gly Tyr Gly Asp Ala Phe Gly Lys Gly Gly		
	155	160 165
Gly Ser Val Ile Asn His Arg Lys His Ser Gly Val Leu Ile Arg		
	170	175 180
Gly Leu Arg Asn His Leu Lys Asp Cys Thr Ile Ile Ser Arg Ser		
	185	190 195
Tyr Gly His Ile Val Phe Met Gln Ala Ala Ser Tyr Pro Thr Val		
	200	205 210
Glu Gly Cys Tyr Ile Glu Gly Glu Met Arg Ser Thr Asp Asp Met		
	215	220 225
Leu Ala Glu Glu Gly Thr Gly Ser Pro Ala Asp Asn Val Asp Phe		
	230	235 240
Met Thr Val Trp Gly Tyr Lys Leu Pro Ala Gly Tyr Met Met Ser		
	245	250 255
Leu Gln Glu Gly Gly Ile Arg Ala Tyr Asp Ala Gly Thr Thr Tyr		
	260	265 270
Ile Asp Gly Glu Val Ile Gln Arg Ala Thr Asp Asn Pro Thr Val		
	275	280 285

Leu Asn Cys Thr Ile Lys Asn Ala Arg Thr Gly Val Thr Leu Ala	290	295	300
His Ala Lys Gly Thr Lys His Val Glu Asn Val Lys Ala Ile Gly	305	310	315
Cys Glu Gln Gly Tyr Ser Ile Gly Ser Gly Thr Val Ser Asn Cys	320	325	330
Ser Gly Asp Ala Gln Tyr Gly Pro Leu Leu Ser Phe Ala Tyr Ser	335	340	345
Ser Asp Lys Asn Thr Asn Ile Asp Ile Glu Val Leu Pro Ala Glu	350	355	360
Asn Tyr Tyr Asn Gly Ser Glu Thr Ala Ala Tyr Val Gly Gly His	365	370	375
Ser His Asn Ile Thr Leu Arg Gly Gly Asp Pro Asn Ala Asp Leu	380	385	390
Arg Val Gln Val Gly Gly Glu Lys Asn Asn Val Arg Leu Leu Gly	395	400	405
Val Thr Ser Asn Gln Asn Pro Leu Ser Ala Ser Asn Leu Glu Leu	410	415	420
Asn Asn Leu Thr Asn Phe Pro Val Val Leu Asp Glu Met Ser Ser	425	430	435
Asn Ile Ile Val Glu Ser Cys Gly Glu Val Thr Asn Asn Gly Ser	440	445	450
Asn Asn Ser Ile Thr Asp Cys Pro Asp Gly Pro Ile Ser Phe Pro	455	460	465
Asp Ser Ser Lys Ala Tyr Arg Leu Gly Asn Asn Arg Phe Thr Phe	470	475	480
Trp Val Ala Ala Asn Gly Gly Asp His Ala Tyr Ser Ile Lys Tyr	485	490	495

Asn Asp Gly Ile Ser Gly Asn Ile Asn Asp Tyr Glu Asp Leu Phe		
500	505	510
Pro Glu Gly Glu Glu Ser Phe Trp Val Phe Thr Pro Val Glu Gly		
515	520	525
Arg Asp Gly Tyr Phe Phe Val Asp Cys Val Gly Gly Gly Asp Lys		
530	535	540
Gln Arg Leu Ser Ala Thr Thr Asp Ser Gly Leu Pro Val Met Val		
545	550	555
Ser Lys Thr Ile Thr Ser Ala Ser Val Gln Trp Ser Val Val Gln		
560	565	570
Pro Glu Gly Arg Asp Thr Phe His Ile Thr Asn Asp Tyr Ala Arg		
575	580	585
Met Val Gly Ala Asn Thr Thr Thr Asn Gln Thr Ile Leu Ser Thr		
590	595	600
Val Gly Asn Thr Ser Asn Gln Ser Arg Phe Glu Val Leu Glu Val		
605	610	615
Ser Asn Tyr Ser Leu Ser Ile Lys Asn Asp Ile Leu Asn Asn Asn		
620	625	630
Ile Thr Val Phe Pro Ile Pro Thr Ser Asp Ile Leu Asn Ile Asn		
635	640	645
Leu Lys Asn Met Glu Ser Val Thr Val Glu Leu Tyr Asn Ser Ile		
650	655	660
Gly Gln Lys Ile Leu Ser Lys Glu Ile Lys Gln Gly Glu Asn Thr		
665	670	675
Leu Asn Leu Ser Gly Ile Tyr Thr Gly Val Tyr Leu Leu Lys Leu		
680	685	690
Asn Asp Gly Gln Asn Ser Tyr Thr Lys Arg Ile Ile Met Lys		
695	700	

配列番号 : 5

配列の長さ : 2442

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

起源

生物名 : アルテロモナス スピーシーズ (*Alteromonas* s p .)

株名 : SN-1009

配列 :

```
ATGAAAATAC GTAATGTTTG TCGTAGTGCG GTGCTTTTAG GCTTGATGTC TTAAATACA   60
TACGCAGAAA CAAAAGCTGA TTGGATGCAA GGTAAGTGGG GGATCAGTTA TCGAATACCT  120
GGAGGAGATA TTAATTACTC AGGTAGTCAT GTTGCAGAAT ACAATGTAAG AGCCGCAGTT  180
GAACAAATCT CAGCAATTCC TGGTTTGAAG TGGGTACAAA TTAATTTAAC CAACGGTGCA  240
TCTGGTGATC GTTTTATAGT CCCTGTAACA GAAGTTGAAG CCATTAATCC TTTATCCGCT  300
CCTAACAGTA TTAATGACTT ATACGATCCT ACTTTACCTG GCGGAGATCT TTTTGAGCAA  360
CTGGCATTAG CCTTCAAAGC TAAAGGCATA AGAGTTGTTG CTTATATTGC GACTCAAGGG  420
CCTGGCATGC TCAAGCATGG TGCTGAAAAC TCGATGGATG AAGATGACTC CATTACTGAC  480
TGTAATCGT CTAAGCCATT AGTAACCGAT CTTGATACAC AAGTTTACTG TTCAGCAAAT  540
ATGAATCGCT GGAGAGATTA CGTTTTAGAA CAATACCCAT CAACCAGTCT TTATAGAAGT  600
TTTGAATTGG CAATGGTCAA TATTGTAGAA ACATTATCAC TGCGTTATGG AAGTACAATT  660
GATGGCTGGT GGTTTGATCA TTCAGGTTTT GGTGACAGTG AATTACTTCA TGCTGCGGCT  720
CTAGCTGGAA ATAATGATGC GGCAGTAGCC TTTAATGAAG GCGATAAAGT TCCTTTGGTA  780
AATAACCCAG AGACATTAGA CGATTACACC TTTGGTCATC CAACACCTAT AGGTAGTGAG  840
GTTTCTTCTG ATGATAAAAA CCTACCTATG TTAACGTCTA TAGAAGCTAC TTTAGATGGT  900
ATTTTAACTG GTTCAGGTGA TGATGTAGGC TCTGTGGGAC ATATGTTTAT GCCACTTCAA  960
GAAAGTTGGA ATGGTGGCAC TGTTGTATTT TCTGAAGCGA AAGGATCTGA CTGGCTTAAT 1020
CGAGCATTAA AAGCCGGAGG TGCATTTACA TGGGCACTAA GCCAAGACAG TAATGATGAG 1080
```

TTAGGTGGTG GCGGAGCAAG ATTAATTTCA GAACCGCAGG TAAAAATGCT TGAACGTATG 1140
AGTTTTAATA TAGGTAAACA ATTACATATG AATCTAGATG GTTCAGATGG TGATACTGCT 1200
TATGATGACT CCGTCAACCA ATATACCGCT ACTGTAAACG GTGCTAATTT TGTGATGAT 1260
GTTACAAGAG GAAAAGTTGC AAGTTTTACT GAAGACGACC AGTTAGAACT AGACAATTAT 1320
CAAGGTATTT CAGGTGGAAA TGC GCGTACA ACCATGGCTT GGATAAAAAC TTCAGACAGC 1380
AAAGGCGATA TTATTGATTG GGGTAATAAC ACAACAAGCG AACGTTGGTG GTTACGTTTA 1440
GTTGACGGTA AATTTAAACT GATATTAAAA GGTCTAATC TTACAGGAAC TACAACACTT 1500
AATGACGACC AATGGCACCA TATTGCTGTT GTAGCTTCTG ATAACGTAGT TGCTAATATC 1560
AAAGTATACA TTGATGGTGT TTTAGAACT GTTGCTGTAA ATGACAATGC TTCAACTACC 1620
TTCGATACAA CCTTAGGTGG CAATATACAA ATAGGTGGGG CCTACACCGG ACTTATCGAT 1680
AAAGTGCTTG TGCATGATAG AGCATTAGAT GAAAGCGAGA TTGAGTATGT TGTTAATTCA 1740
TCCAATGCTG ATCTTGATTT AGAGGTTGCA TTAGATGTGC GTTTTGAAGA GTCAGCAAAC 1800
TCAACTAAAG TAACCGATAA TTCTATATAT GGACGTCATG GCACAAATCG AGGTGCTATT 1860
ACTGGCGTGT TTGATGCAGA ACGTAACAGC AATGTGTACT CACTTGATGG TGTGATAGT 1920
GGCGAAGATA TAAATGATTT AAAAGATAGC GACTACGAAC ATGAAGTTGT AATGACAACA 1980
GATAATTCTA AAGACTCAAA AGGTTATAGT GGAGTTAATG GTGCAGGTCC GCGTACTGTA 2040
ATGGCATGGA TAAAAACAAC TTTTGGCGGT GCTGTTATTG CCAATGGGG TAATAAAAAT 2100
TCAGTTGATG GCGAACAATA TGAAGTTCGT TAAAAAATG GTGCACTGAG ATTAGATATT 2160
ACAGGTGGCA TTATTAAAGG CACAACATCA ATTAATGATG GCGAGTGGCA TCATATTGCT 2220
GTGGTTTCAC CTGATGAACA GTTAGCTAAT ACTAAATTGT ATGTTGATGG TGTACTAGAA 2280
ACAGCAACCA CTTGGGTTT TCAAGCAACG ATTGATACTA AACTCTTAA TGGCGATAGC 2340
AAAGACGTAA TAATTGGTAG TACGTTTGTT GGCGAGATGG ACGATTTTAT TATTCATCAA 2400
CGCGCTTTAA GACAGTTTGA AGTGAAAAAC TCAGCAGGAC TC 2442

配列番号 : 6

配列の長さ : 2643

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：アルテロモナス スピーシーズ (*Alteromonas* s p.)

株名：SN-1009

配列：

```
ATGAAAATAC GTAATATGTG TTGTACTGCT TTAATCGTAA GTTTAATGGG CTGCGGTGGT 60
TCTGGTTCAG AAGCTAGTTC TCCTGAAGTA GAAGTTGATA ATGGAGTAGA AATTCAACCT 120
GAACCAGAAG TTGAACCTGA GCCAGAAGTT GAACCTGAAC CAGAAGTTGA ACCTGAACCA 180
GAAGTTGAAC CTGAACCAGA AGTTGAACCT GAGCCAGAAG TTGAGCCTGA ACCAGAAGTT 240
GAACCTGAAC CAGAAGATAT AAGAGCCTCA TGGATGCAAG GTAAGTGGG AATCAGCTTC 300
AGAATTTCTG GTGGTGACAT CAGTCAAAAT GAAAGTCATG TAAATGAATA CCAAGTAGCA 360
CCAGCTGTTG AGCAAATAGC CGCAATTCCT GGATTAAAGT GGTTACAAGT TAATTTAAGT 420
AACGGGGCTT TTGGCGACCG TTTTATTGTA CCTGTACCTG AAGTAGAAGC TATTAATCCA 480
AATTCAGCGC CAAACAGCTC GGCAGATTTA TTTGATCCTG CATTACCTGG CGATGACTTA 540
TTTGAACAAA TAGCACTAGG ACTTCAAGCC AAAGGCATAA AAGTAGTAGC ATATATTGCG 600
ACTCAAGGTC CTGCAATGCT GAAACATGGC GCAGAAAGAT CGATGGATTT TGATGATTCT 660
ATTGTTGATG AATCAGATGG CAGTGCTTGT AAATCTTCAA GACCTGTCGT TTCTGATCCT 720
GATACGCAAG TTTATTGTTC AGCAAATATG AATCGCTGGA GAGATTATGT GTTACAGCAA 780
TACCCATCAA CAAGTTTGCA TCATAGTTTT CAATTGGGAC TCGTCAATAT TGTAGAAACT 840
TTATCACTAC GTTACGGCAC TCTGATTGAT GGTTGGTGGT TTGATCATTG TATTTACGGT 900
GACTACAACT TACTTCCTGA TGCTGCAAGA GCGGGAAATA GCAATGCTGC GGTTTCTCTT 960
AATTTAGAAG GGGATATTTT CTTAAGTAAT AAGCCAGAAG TGATGGAGGA TTTTACCGGC 1020
GGACATCCAA CACCGATTGC TCGAGTTGTT TCATCTGATG ATACCAATTT ACCCATGTTA 1080
ACGGCTATAG AAGATGCTCC AAACGGTATT TTTACAGGAA CAGGTGATGA TGTAGATGCT 1140
TTAGGGCACA TGTTTTTACC GCTGCAAGAA ACCTGGAATG GCGGAACTGT AGTATTTTCA 1200
GAAGCCAAAG GAACTGAGTG GCTTAACAGA GTTACTCGAG CTGGCGGCGC ATTAAGTTGG 1260
GCATTAAGCC ATGAAGGCAG TGTTTCTGGT GGTGAGGCTA TGTGATTTC TGCACCACAA 1320
```

GCAAAAATGC TTGCACGTAT GCAGCTAAAT ATTGGTAAAC AACTCGATAT GGATTTAGAT 1380
GGTGCCGATG GCGCTACGGC TTATGATGAT TCTGTCAATC AACATACAGC TACGGTTACA 1440
GGTGCGACAT TTATAGATGA TGTTACTCGT GAAAAAGTGG CAAGCTTTAC TGAAACAGAT 1500
CTGATTACGT TAAACAATTT TACTGGTATT TTAGGCGAAA GTGCTCGTAC AACAATGGCT 1560
TGGATAAAAA CATCAGACAG TAACGCAGAT GTTATTCAAT GGGGTAAACA AGAGACGAGT 1620
GAAGCTTGGT ATGTGGGCTT AGACAATGGA ATACTTCAAT TAAATATTCA AGGTTCTACG 1680
GTTATTGGCG CAAGTGTAAT TAACGATGAT AGTTGGCATC ATATTGCTGT TATCGCGCCT 1740
GATAATTCAA TTGCCAATAC TCAAGTCTAT ATCGATGGTG TTTTAGAAAC ACTTACCGTG 1800
AATGATGGTG GTTCATCTAC ATTTAATACA GTGGCAGACA CCAACGTTGT AATAGGAGGA 1860
GAGTTTACTG GCCTTATAGA TAAAACCGTT GTGTATAACA GAGCATTAGA AGAAAGCGAG 1920
ATTGATTATA TTGTTAATTC AGCTGACGCA GATATTGATT TAGGTATTTT ACTTGATGTG 1980
AGGTTTGATG AAGATGCTAA TGCAACAACA GTAGCTGATA ATTCTGCCTA TGAACGTTCA 2040
GGTATAAATC GAGGTGCCAT TACGGGCGTT TTTGATGCAA CACGTAACAG CAATGTTTAT 2100
TCACTTGATG GTGTTGATAG CGGCGAAGAT CTAGATGATT TAATAGATAG TGATTATGAG 2160
CATCAAATTG TTATGACAAC CAATAACAAA AGAGATAACA AAGGTTATAG TGGCGTGAAT 2220
GGCGGTGATC CTCGAACTGT TATGGCATGG ATAAAAACAA CCTTTGGTGG TGCTGTTATT 2280
GCTCAATGGG GTAATAAAGA TTCAGTCGAT GGCGAACAAT ATGAAGTGCG CTTGAAAAAT 2340
GGCGAACTTA GAGTCGATAT CACTGGCGGG CTTATTAAAG GAACAACATT AATAAACGAT 2400
GGCGAATGGC ATCATATTGC TGTGTATCT CCTGATGATC AATTAGCTAA CACTAACTT 2460
TATGTTGATG GTGTTCTAGA AACGACCACC ACCTCCGGCT CTCAAACAAC AATAGATACG 2520
TTAACCCTTA ACGGTGACAG CAAAGACGTA ATCATTGGAA GTACTTTTGT TGGCGAGATG 2580
GATAACTTTG TTATTCATCA ACGTGCTTTA AAACAATTTG AAGTAAAAGT CGCCGCAGGT 2640
ATT 2643

配列番号 : 7

配列の長さ : 2091

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：フラボバクテリウム スピーシーズ (Flavobacterium s p.)

株名：S A - 0 0 8 2

配列：

```
ATGATAAAAA AATACAATTT AATTAAAACA GGAGTTATTA CATTTCTAGT TTTGTTTTTT 60
CAGCAAACCTT ACGCACAAAC AACCACAGTA TATTCTTTAG AAGACTTACT ACCCTATTTA 120
AAACAGGATA ATGTAGATGT TAAATTAGCC CCAGGAACTT ATAATGTAA TGGTTTTGAT 180
GTAGGTGAAG ACAGGTTGTT TTCCACTACT CCACTTTTTT TGTTTGAAGG GTCTAACAGT 240
ACTTATGACT TTACAGATGT AAAGCTTAAC ATCAATACGG TTGTGTTAAC CAAGTTTGGA 300
AATAATGAGG TTAATGAAAT TCAGATTTTA GGAAATAACA ATGTTCTTAA AACTTAAAA 360
CTAGAAGATA TTGGAACAAC AGCTCCTTCT AACAGAGCTC AGTCTATTGT TATAGATGGG 420
CGAGACAATA GAATAGAAGG TTTTCATTTA ACCATTAGAG GATCTTACCC TTATGGATAT 480
GGAGATGCTT TTGGAAGG AGGAGGTTCC GTAATTAATC ACCGAAAACA TTCAGGTGTT 540
TTAATAAGAG GATTACGTAA TCACCTAAAA GATTGTACCA TTATTTCTCG TTCTTATGGG 600
CATATAGTAT TCATGCAAGC AGCAAGTTAC CCAACTGTGG AAGGTTGTTA TATTGAAGGT 660
GAAATGCGTT CAACCGATGA TATGTTGGCA GAAGAAGGAA CAGGTTCTCC AGCAGATAAA 720
GTAGATTTTA TGACGGTTTG GGGATATAAG TTACCAGCTG GTTATATGAT GAGTTTACAA 780
GAAGGAGGAA TTAGAGCATA TAATGCAGGA ACCACTTATA TTGATGGAGT AGAGATTCAA 840
CGAGCAACAG ACAACCCTAC CGTTCTAAAT TGTACTATTA AAAATGCAAG AACAGGAGTA 900
ACATTAGCAC ATGCAAATGG AACAAAATAT GTTGAGGGTT GTACTGTTTT AGGATGTGAA 960
AATGGATACT CCATAGGAAG TGGAAGTGTG GTAAACTGTG GAGCAGATGC TATTTATGGA 1020
CCTGTATTTA AAAATACATA CGGAAGCGAT AAAGGGTACA ATGCAGACAT TACCATTTTG 1080
CCACCTAGTG ATGCTTACTA CAACGGACAT GATGCTGTAG CATACTTGG AGGATCAAAT 1140
CATAACCTTA CTTTTAGAAG TGAAATAACA GAAATTCCAA GCAATTTAAA AATTATGGTC 1200
TCTGGAGATT TACAAGGATT AAGAGTATTG CATGGAAGTA ATCCTAGTCA GAATAATTTT 1260
GCTGGAACCA ACATTGTTTT AAGAAATTTA ACAAACCTTC CTGTAGACTT ACATTCAGAC 1320
```


AGTTCTAATA TAACTGTTAC TTCTTGTGAT ACGGATAATA TTACAGACAA TGGTACAAAT 1380
AATAGTATTG AAGCTATAGA TTGCGATTCTG GATAATTTAG CTTTAAAAGG AGAAGCTAGT 1440
CAATCATCCT CTCGTCCAAG TGATGGTTTT GCAGCAAATG CCATTGATGG AAATACAAAT 1500
GGGGCATGGT CAAACAATTC TGTTTCTCAT ACGGGTACAG AAGAAAATCC ATGGTGGCAA 1560
GTAGATTTAG GAACAGATGC TATTATAGGT AGCATCAATA TTTTAAACAG AACAGATGGT 1620
TGTTGTAAAG GTAGATTAGA TAATTTTACT GTTTACGTGA TAGATAAAGA TGATAAGGTT 1680
ACATTTTCTA AAACCTATGT TACCGTTCCA GATCCGTCTA TAACTGTTGA TGCAGGTGGT 1740
GTGAATGGAA AAATTGTAAA AATTGTTTTG AATAACAGTT CACAGGCTTT GGCTTTAGCA 1800
GAGGTAGAAG TGTACGGAAC GTCTTTGTCT AATAAAGAAA CTATAAAGAA TCCTATTCAT 1860
TTTTATCCTA ACCCGGTAGA AGATGAGGTA ACTATTTCTT TAGAGTCAGC CGATTTAAAT 1920
TTAAACGAGA CTCGAGTTGT TATTTATAAT ATAAAAGGTC AAAAAATACT AGAAACAAC 1980
CCAAGTAATT CCACGGAAGT TAATTTAAAC TTATCTCACT TACCAACAGG AGTTTATTTA 2040
ATAAGAGTAA GCGATCAAAA TAAAAATATC ATAAATAAAA TTGTAAAATT A 2091

配列番号 : 8

配列の長さ : 2112

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

起源

生物名 : フラボバクテリウム スピーシーズ (Flavobacterium s p.)

株名 : SA-0082

配列 :

ATGAAAAAAT ATTCTATCCT AAAAATAGGA ATTATAGCTG TTATAATGTT GTTTGTTTAC 60
CAGTCTTACG CACAAACAAC CACAGTATAT TCTTTAGAAG ACTTACTACC CTATTTAAAA 120
CAGGATAATG TAGATGTAA ATTAGCCCCA GGAAGTTATA ATATCAATGC ATTTGACATT 180
ACTCAAGGAA AATTTTCGAA CCCCTTATTT CTTTTTGAAG GGTCTAATAA TACTTTTGAT 240

TTTACAGATG TTAAAATAAA CATCAATACT CTGGTGTTAA CAAAGTTTGG GAATAATGAA 300
GTCAATGAAA TTCAGATTTT AGGAAATAAC AATGTTCTTA AAAACTTAAA ACTAGAAGAT 360
ATTGGAACAA CAGCTCCTTC TAACAGAGCC CAGTCAATTA TAATGGATGG GCGAGACAAT 420
AGAATAGAAG GCTTTCATTT AACCATTAGA GGATCTTATC CTTATGGATA TGGAGATGCT 480
TTTGGAAAAG GAGGAGGTTT CGTAATTAAT CACCGAAAAC ATTCAGGTGT TTTAATAAGA 540
GGATTACGTA ATCACCTAAA AGATTGTACT ATTATTTCTC GTTCTTATGG GCATATAGTA 600
TTTATGCAAG CAGCAAGTTA CCCAACTGTA GAAGGTTGTT ATATTGAAGG TGAAATGCGT 660
TCAACCGATG ATATGTTGGC AGAAGAAGGA ACAGGTTCTC CAGCGGATAA TGTAGATTTT 720
ATGACGGTTT GGGGATATAA GTTACCAGCT GGTTATATGA TGAGTTTACA AGAAGGAGGA 780
ATTAGAGCTT ATGATGCTGG TACCACTTAT ATTGATGGAG AAGTAATCCA AAGAGCAACA 840
GATAACCCTA CCGTTCTAAA TTGTACCATT AAAAATGCAA GAACAGGAGT GACTTTAGCA 900
CATGCTAAAG GAACAAAACA CGTAGAAAAT GTTAAGGCTA TTGGGTGTGA GCAAGGATAT 960
TCAATTGGTA GTGGTACAGT GAGTAATTGT AGTGGTGATG CTCAGTATGG TCCGTTGTTA 1020
AGTTTTGCTT ATTCTAGTGA TAAAAATACG AATATAGACA TAGAAGTTTT GCCTGCAGAA 1080
AATTATTATA ACGGTAGTGA AACTGCTGCT TACGTTGGAG GACATTCTCA TAATATTACA 1140
CTAAGAGGAG GTGATCCTAA TGC GGATCTT AGAGTTCAGG TAGGGGGAGA AAAAAATAAC 1200
GTTAGGTTGC TTGGAGTTAC TTCTAATCAA AATCCACTTT CTGCTTCAA TTTGGAAGT 1260
AATAATTTAA CTAATTTTCC TGTAGTGTTA GATGAAATGA GTTCTAATAT TATTGTGGAG 1320
TCATGTGGGG AGGTTACCAA TAACGGAAGT AATAATAGTA TTAGTACTG CCCAGATGGA 1380
CCAATTAGCT TTCCAGATTC AAGCAAAGCG TATCGTTTAG GAAATAATAG ATTTACATTT 1440
TGGGTTGCGG CCAATGGAGG AGATCATGCT TATTCTATAA AGTATAATGA TGGTATTAGT 1500
GGTAACATTA ATGATTATGA GGATTTGTTT CCAGAAGGAG AAGAGTCTTT TTGGGTTTTT 1560
ACTCCAGTAG AGGGAAGAGA CGGATACTTT TTTGTTGATT GTGTTGGTGG TGGTGATAAA 1620
CAAAGATTGT CAGCTACTAC AGATAGTGGC TTGCCAGTAA TGGTGTCAAA AACCATTACA 1680
AGTGCATCTG TTCAATGGTC TGTAGTGCAA CCAGAAGGAA GAGATACTTT CCATATAACG 1740
AATGATTATG CTAGAATGGT AGGAGCTAAT ACAACTACTA ATCAAACCAT TTTGTCTACT 1800
GTTGGGAACA CCTCAAACCA ATCTCGTTTT GAAGTTCTTG AAGTTTCTAA CTATTCTTTA 1860
AGTATTAAAA ACGACATCTT AAACAATAAT ATTACGGTTT TTCCTATTCC AACATCTGAC 1920

ATTCTTAATA TAAATTTAAA AAATATGGAG TCTGTTACTG TTGAATTATA CAACTCAATA 1980
GGTCAAAAAA TATTATCAAA AGAAATTAAA CAAGGTGAAA ATACCCTAAA CTTGTCTGGT 2040
ATTTATACAG GAGTTTATTT GTTAAAATTG AACGATGGAC AAAATTCTTA TACAAAAAGA 2100
ATTATTATGA AA 2112

配列番号 : 9

配列の長さ : 7

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

フラグメント型 : 中間部フラグメント

配列 :

Thr Thr Met Ala Trp Ile Lys

1

5

配列番号 : 10

配列の長さ : 18

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

フラグメント型 : 中間部フラグメント

配列 :

Gly Thr Thr Ser Ile Asn Asp Gly Glu Glu His His His Ala Val

1

5

10

15

Val Ser Pro

配列番号 : 11

配列の長さ : 15

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

フラグメント型 : 中間部フラグメント

配列 :

Gly Pro Asn Leu Thr Gly Thr Thr Thr Leu Asn Asp Xaa Gln Thr

1 5 10 15

配列番号 : 12

配列の長さ : 24

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

フラグメント型 : 中間部フラグメント

配列 :

Ala Asp Ile Met Xaa Gly Xaa Xaa Gly Ile Ser Tyr Arg Ile Pro

1 5 10 15

Gly Xaa Asp Ile Asn Tyr Ser Gly Ser

20

配列番号 : 13

配列の長さ : 17

配列の型 : 核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

ACNATGGCNT GGATHAA

17

配列番号：14

配列の長さ：15

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CATGAAAATA CGTAG

15

配列番号：15

配列の長さ：15

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

GATCCTACGT ATTTT

15

配列番号：16

配列の長さ：30

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Xxx	Pro	Ala	Gly	Tyr	Met	Met	Ser	Leu	Gln	Glu	Gly	Gly	Ile	Arg
1				5				10					15	
Ala	Tyr	Asn	Ala	Gly	Thr	Thr	Tyr	Ile	Xxx	Gly	Val	Glu	Ile	Gln
				20				25					30	

配列番号：17

配列の長さ：22

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Gly	Glu	Ala	Ser	Gln	Ser	Ser	Ser	Arg	Pro	Ser	Asp	Gly	Phe	Ala
1				5				10					15	
Ala	Asn	Ala	Ile	Asp	Gly	Asn								
				20										

配列番号：18

配列の長さ：19

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Xxx Tyr Val Thr Val Pro Asp Pro Ser Ile Thr Val Asp Ala Gly

1 5 10 15

Gly Val Asn Gly

配列番号 : 19

配列の長さ : 18

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Phe Gly Asn Asn Glu Val Asn Glu Ile Gln Ile Leu Gly Asn Asn

1 5 10 15

Asn Val Leu

配列番号 : 20

配列の長さ : 17

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Tyr Val Glu Gly Cys Thr Val Leu Gly Cys Xxx Xxx Gly Tyr Ser

1 5 10 15

Ile Gly

配列番号 : 21

配列の長さ : 17

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

TTYGGNAAYA AYGARGT

17

配列番号：22

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

AAAYAYGARG TNAAYGARAT HCARAT

29

配列番号：23

配列の長さ：675

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：

配列：

AATAATGAGG TTAATGAAAT TCAGATTTTA GGAAATAACA ATGTTCTTAA AAACCTAAAA	60
CTAGAAGATA TTGGAACAAC AGCTCCTTCT AACAGAGCCC AGTCAATTAT AATGGATGGG	120
CGAGACAATA GAATAGAAGG CTTTCATTTA ACCATTAGAG GATCTTATCC TTATGGATAT	180
GGAGATGCTT TTGGAAAAGG AGGAGGTTCC GTAATTAATC ACCGAAAACA TTCAGGTGTT	240
TTAATAAGAG GATTACGTAA TCACCTAAAA GATTGTACTA TTATTTCTCG TTCTTATGGG	300

CATATAGTAT TTATGCAAGC AGCAAGTTAC CCAACTGTAG AAGGTTGTTA TATTGAAGGT 360
GAAATGCGTT CAACCGATGA TATGTTGGCA GAAGAAGGAA CAGGTTCTCC AGCGGATAAT 420
GTAGATTTTA TGACGGTTTG GGGATATAAG TTACCAGCTG GTTATATGAT GAGTTTACAA 480
GAAGGAGGAA TTAGAGCTTA TGATGCTGGT ACCACTTATA TTGATGGAGA AGTAATCCAA 540
AGAGCAACAG ATAACCCTAC CGTTCTAAAT TGTACCATTA AAAATGCAAG AACAGGAGTG 600
ACTTTAGCAC ATGCTAAAGG AACAAAACAC GTAGAAAATG TTAAGGCTAT TGGGTGTGAG 660
CAAGGATATT CAATT 675

配列番号 : 24

配列の長さ : 14

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

His Ser Gly Val Leu Ile Arg Gly Leu Arg Asn His Leu Lys

1

5

10

配列番号 : 25

配列の長さ : 10

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Leu Asn Ile Asn Thr Val Val Leu Thr Lys

1

5

10

配列番号 : 26

配列の長さ : 21

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列 :

GTTCAATAGT AACAGCAAAC C

21

配列番号 : 27

配列の長さ : 28

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列 :

CCGGATCCCA AACAAACCACA GTATATTC

28

配列番号 : 28

配列の長さ : 21

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列 :

TCCATCAATG GCATTTGCTG C

21

配列番号 : 29

配列の長さ : 14

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Gly Ser

1

5

10

配列番号 : 30

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列 :

ATGTTACCAC TAATACCATC

20

請 求 の 範 囲

1. フコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチド、又はその活性と機能的に同等の活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列を有する単離された遺伝子。

2. ポリペプチドがアルテロモナス属細菌由来のものである請求の範囲1記載の遺伝子。

3. ポリペプチドが、下記理化学的性質を有するフコース硫酸含有多糖に作用して、該フコース硫酸含有多糖を低分子化させる活性を有することを特徴とする請求の範囲1又は2記載の遺伝子。

(a) 構成糖：ウロン酸を実質的に含有しない。

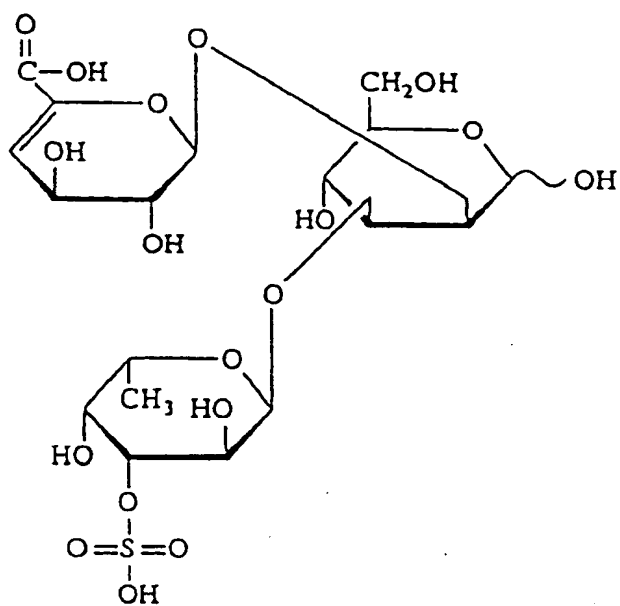
(b) フラボバクテリウム sp. SA-0082 (FERM BP-5402) の生産するフコイダン分解酵素により実質上低分子化されない。

4. ポリペプチドがフラボバクテリウム属細菌由来のものである請求の範囲1記載の遺伝子。

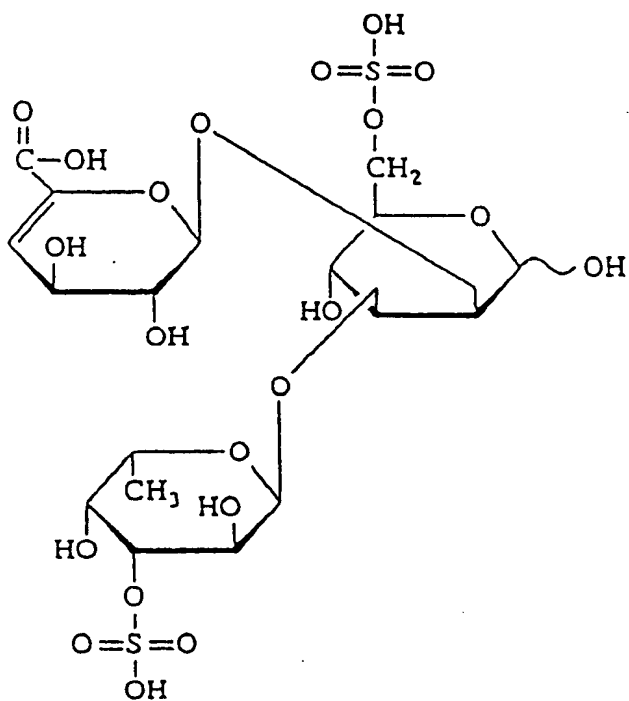
5. ポリペプチドが、下記理化学的性質を有するフコース硫酸含有多糖に作用して、該フコース硫酸含有多糖を低分子化し、下記式〔I〕、〔II〕、〔III〕及び〔IV〕から選択される少なくとも1以上の化合物を遊離させる活性を有することを特徴とする請求の範囲1又は4記載の遺伝子。

(c) 構成糖：ウロン酸を含有する。

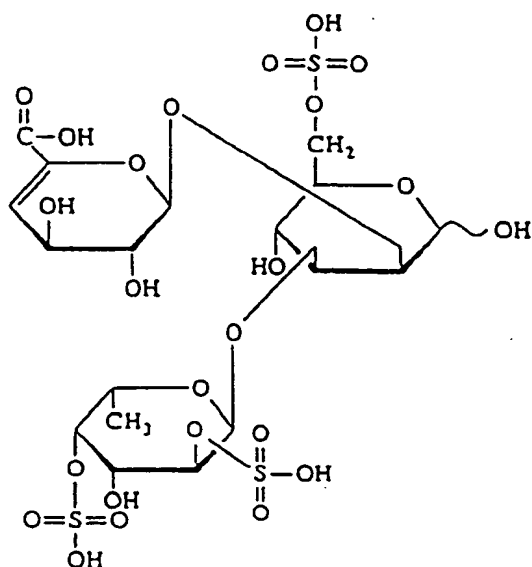
(d) フラボバクテリウム sp. SA-0082 (FERM BP-5402) の生産するフコイダン分解酵素によって分解される。



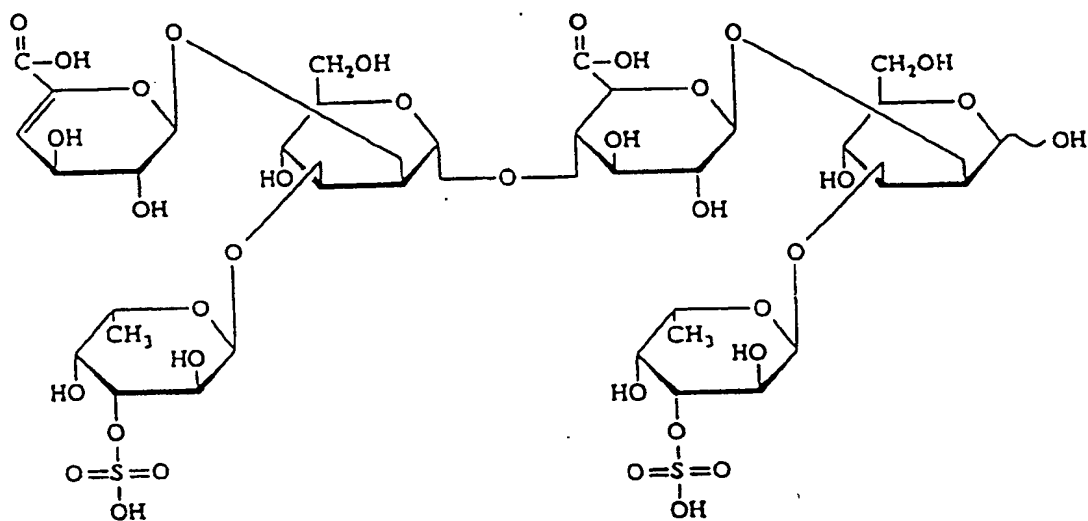
[I]



[II]



〔III〕



〔IV〕

6. 配列表の配列番号 1～4 のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、若しくは配列番号 1～4 のいずれかで表されるアミノ酸配列の一部を含むフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチド又はそれらの活性と機能的に同等の活性を有するポリペプチドをコードすることを特徴とする請求の範囲 1～5 のいずれか 1 項に記載の遺伝子。

7. アミノ酸配列をコードするDNAが、配列番号5～8のいずれかで表されるDNA配列を有する遺伝子、若しくは配列番号5～8のいずれかで表されるDNA配列の一部を含む遺伝子であって、かつフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチド又はそれらの活性と機能的に同等の活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子であることを特徴とする請求の範囲6記載の遺伝子。

8. 配列表の配列番号1～4のいずれかで表されるアミノ酸配列に、1個若しくは複数のアミノ酸配列が欠失、付加、挿入若しくは置換の少なくとも1つがされており、かつフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子であることを特徴とする請求の範囲1記載の遺伝子。

9. 請求の範囲2～8のいずれか1項に記載の遺伝子と厳密な条件においてハイブリダイズすることができるフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドをコードする請求の範囲1記載の遺伝子。

10. 請求の範囲1～9のいずれか1項に記載の遺伝子を含んでなる組換えDNA。

11. 請求の範囲10記載の組換えDNAが挿入されてなる、微生物、動物細胞又は植物細胞を宿主細胞とする発現ベクター。

12. 請求の範囲11記載の発現ベクターにより形質転換されてなる形質転換体。

13. 請求の範囲12記載の形質転換体を培養し、該培養物よりフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチド又はその活性と機能的に同等の活性を有するポリペプチドを採取することを特徴とするフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチド又はその活性と機能的に同等の活性を有するポリペプチドの製造方法。

14. 配列表の配列番号1～4のいずれかで表されるアミノ酸配列を有し、かつフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチド又はその活性と機能的に同等の活性を有するポリペプチド。

15. 配列表の配列番号1～4のいずれかで表されるアミノ酸配列に、1個若しくは複数のアミノ酸配列が欠失、付加、挿入若しくは置換の少なくとも1つがさ

れており、かつフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチド、または配列番号 1～4 のいずれかで表されるアミノ酸配列の一部を含み、かつフコース硫酸含有多糖分解活性を有するポリペプチドであることを特徴とする請求の範囲 1～4 記載のポリペプチド。

図 1

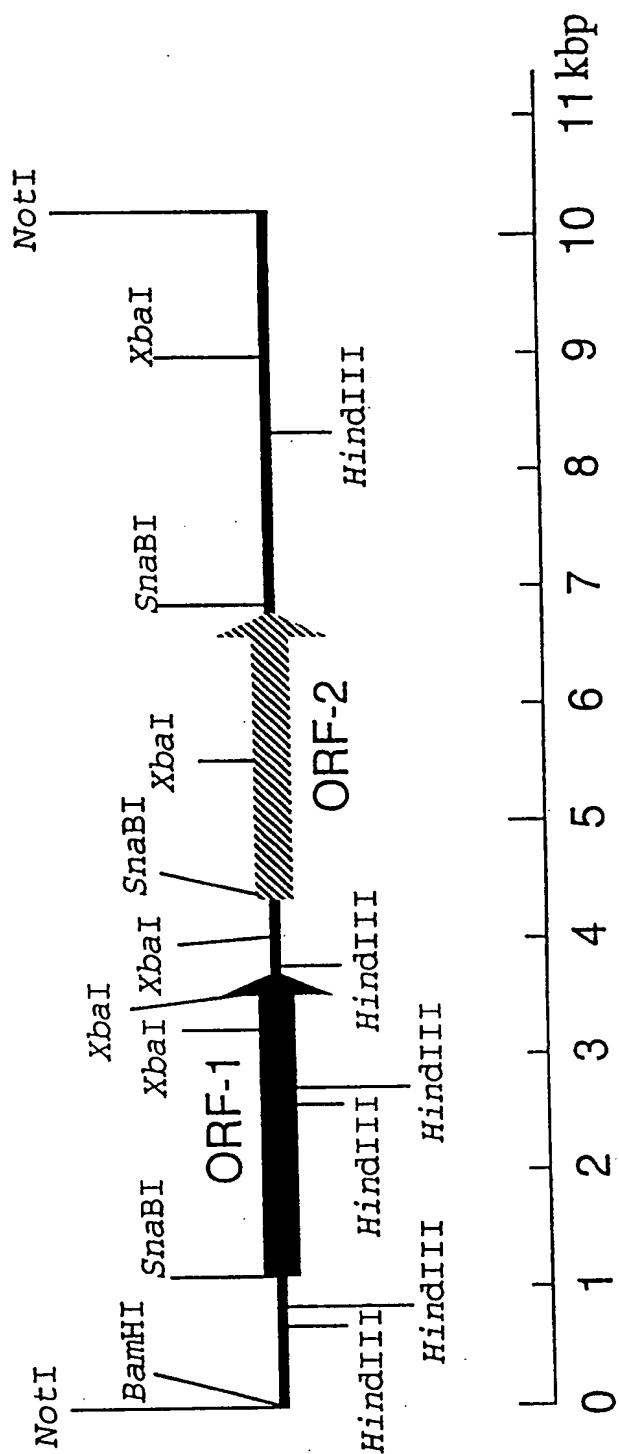


図 2

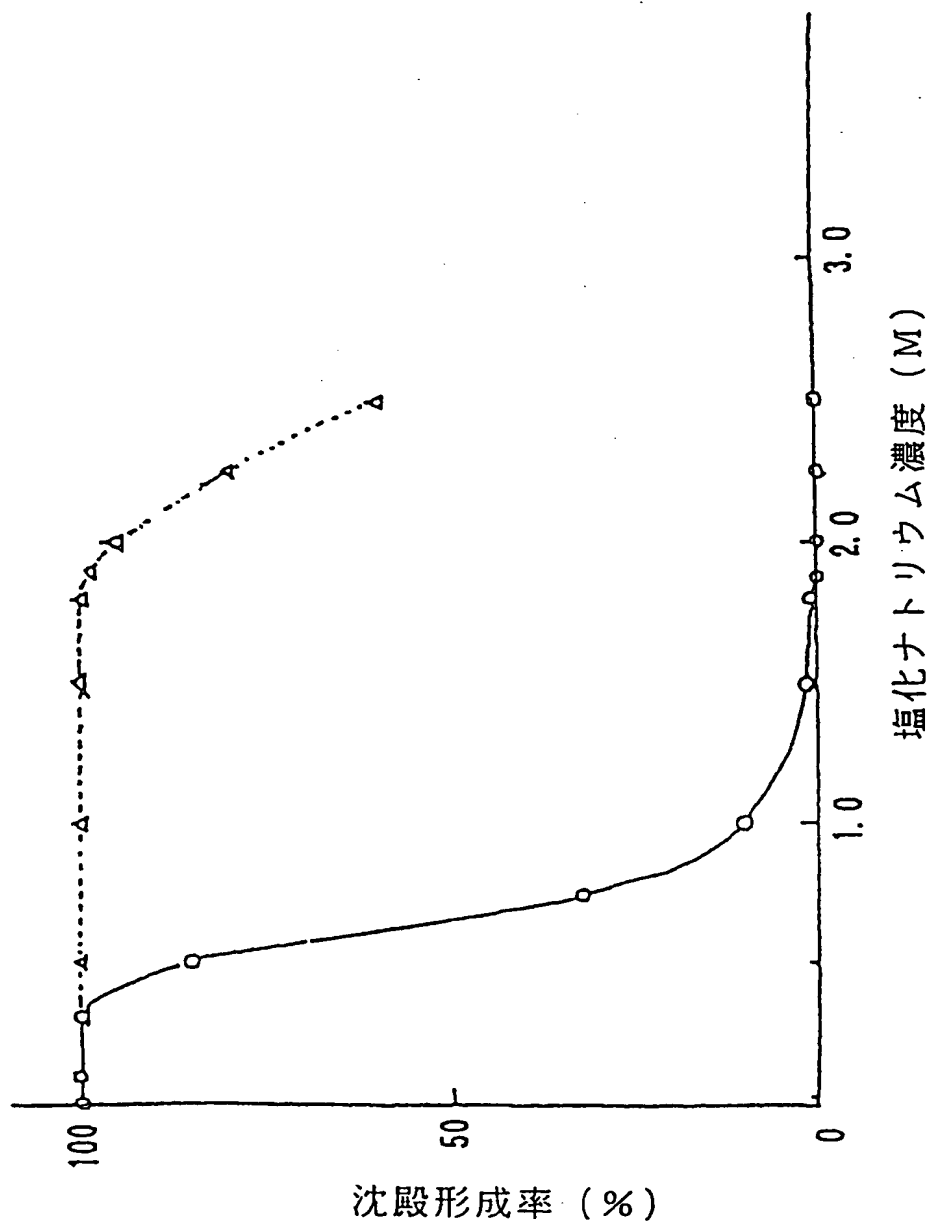


図 3

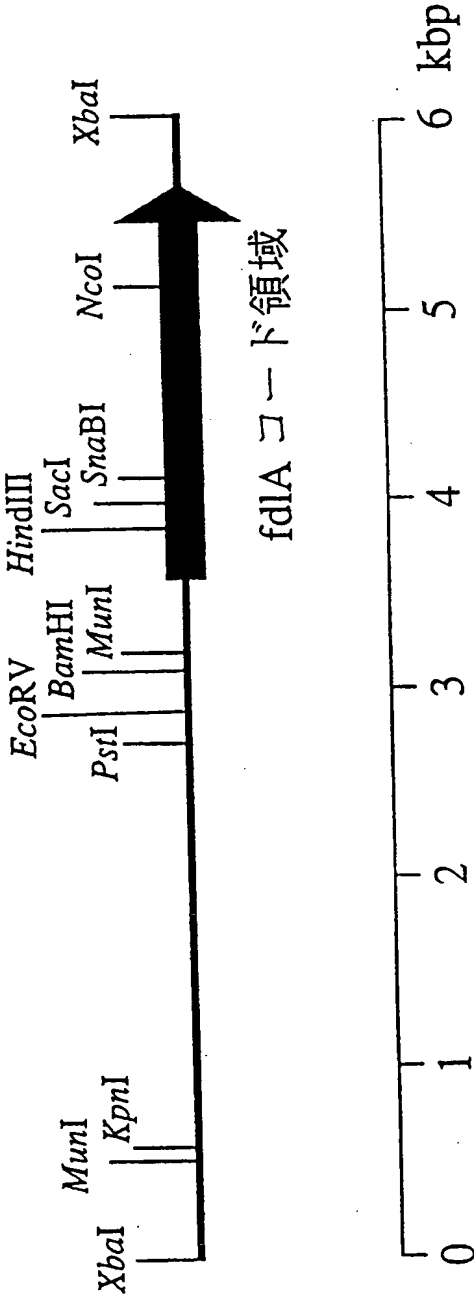
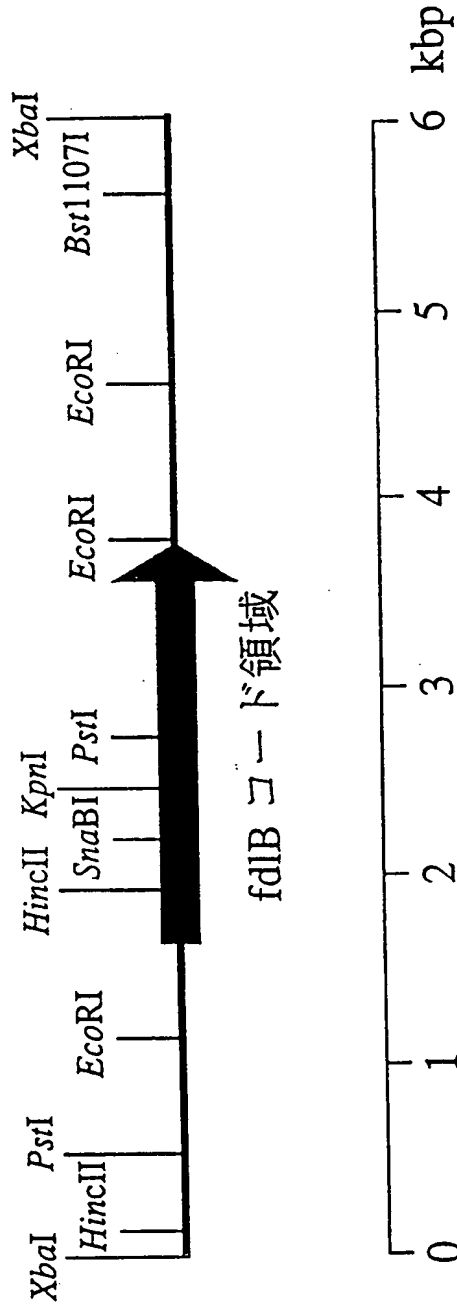


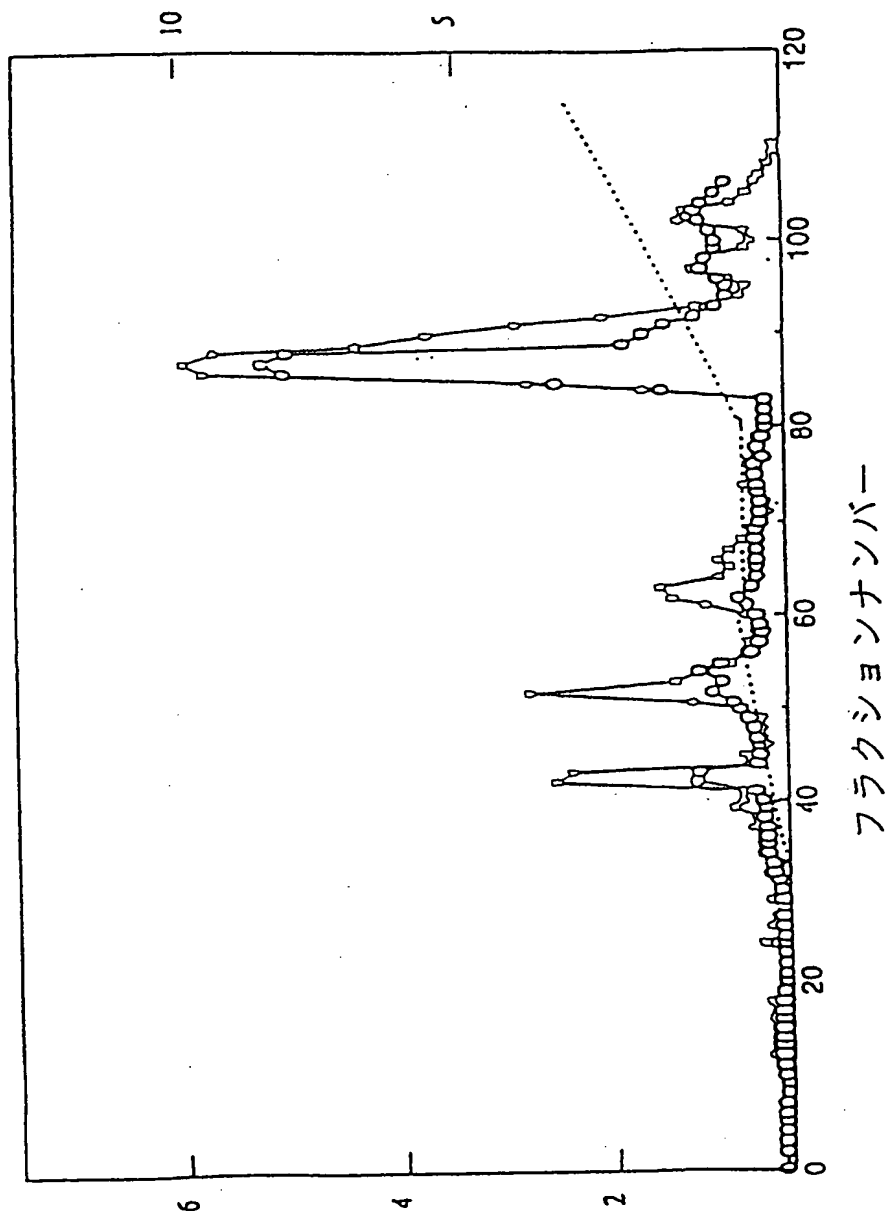
図 4



酢酸アンモニウム (M)



不飽和グルクロン酸含量 (—○—)



フェノール硫酸法による糖含量 (—○—)

5
✕

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP98/02310

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12N15/56, C12N15/63, C12N9/24, C12N1/21

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N15/56, C12N15/63, C12N9/24, C12N1/21

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), GenBank/EMBL/DBJ/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> Y	Ken, Sakai et al., "Partial purification and Characterization of an Enzyme Releasing 2-Sulfo- α -L-fucopyranose from 2-Sulfo- α -L-fucopyranosyl-(1-2) Pyridylaminated Fucose from a Sea Urchin, <i>Strongylocentrotus nudus</i> " Biosci. Biotech. Biochem. (1996) Vol. 60, No. 4 p.666-668	<u>1, 8-13, 15</u> 4-15
<u>X</u> A	WO, 96/34004, A1 (RES INST GLYCOTECHNOLOGY & TAKARA SHUZO CO LTD), October 31, 1996 (31. 10. 96) (Family: none)	<u>1, 4-15</u> 2-3
Y	Fu-gong, Yu. et al., "Apoptosis of human carcinoma cell lines induced by fucoidan (Sulfated fucose-containing polysaccharide) and its degraded fragments by fucoidanase and endo-fucoidanlyase" Abstracts of 18th Symposium of Carbohydrates, Nihon Toshitsu Gakkai (1996) p.93-94	4-15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
August 7, 1998 (07. 08. 98)

Date of mailing of the international search report
August 18, 1998 (18. 08. 98)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 98/02310

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl[°] C12N15/56, C12N15/63, C12N9/24, C12N1/21

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl[°] C12N15/56, C12N15/63, C12N9/24, C12N1/21

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Ken, Sakai et al. "Partial purification and Characterization of an Enzyme Releasing 2-Sulfo- α -L-fucopyranose from 2-Sulfo- α -L-fucopyranosyl-(1-2) Pyridylaminated Fucose from a Sea Urchin, <i>Strongylocentrotus nudus</i> " Biosci. Biotech. Biochem. (1996) 第60巻 第4号 p. 666-668	1, 8-13, 15 4-15
X A	WO, 96/34004, A1 (RES INST GLYCOTECHNOLOGY & TAKARA SHUZO CO LTD) 31. 10月. 1996 (31. 10. 96) (ファミリーなし)	1, 4-15 2-3

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07. 08. 98

国際調査報告の発送日

18.08.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富士 良宏

印

4 B

9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3449